

生体試料中の6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydroisoquinolineの

高感度螢光定量法

白 幡 晶

生体試料中の6,7-Dihydroxy-1,2,3,4-tetrahydro-  
isoguinolineの高感度蛍光定量法

東京大学大学院薬学系研究科  
薬学専門課程

白 幡 晶

OK

## 略号表

B	: 抗体に結合した標識化合物のカウント
B <sub>0</sub>	: 非標識化合物未添加の場合の B
DA	: ドーパミン
DA-Ap	: 6,7-ジヒドロキシ-1-Xチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン
DA-F <sub>0</sub>	: 7,8-ジヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン
DA-F <sub>p</sub>	: 6,7-ジヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン
DNLCA	: 3',4'-ニトロダノソリン-1-カルボン酸
DOPA	: ドーパ (3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン)
E-F <sub>0</sub>	: 4,7,8-トリヒドロキシ-2-Xチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン
E-F <sub>p</sub>	: 4,6,7-トリヒドロキシ-2-Xチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン
En-F <sub>p</sub>	: 6,7-ジヒドロキシ-2-Xチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン
HPLC	: 高速液体クロマトグラフィー
NE-F <sub>0</sub>	: 4,7,8-トリヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン
NE-F <sub>p</sub>	: 4,6,7-トリヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン
T	: アッセイチューブに添加した標識化合物のカウント
THP	: テトラヒドロハハペロリン
TLC	: 薄層クロマトグラフィー

# 目次

ページ

## 緒言

1

## I イムノアッセイ条件におけるエピネフリンの未知の変化

7

### 1. エピネフリンの未知の変化 及び その変化物の同定

8

### 2. 変化物と抗血清との反応

15

### 3. 変化物の1位の炭素の由来

17

### 4. 考察

19

### 5. 実験の部

23

#### i) 材料 及び 測定機器

23

#### ii) $^3\text{H}$ -エピネフリンの結合実験

24

#### iii) ホウ酸樹脂を用いた分画

25

#### iv) アンバーライト CG-50 によるカ

#### ラムクロマトグラフィ

25

#### v) 日立ゲル3011-Cによる高速液体

#### クロマトグラフィ (HPLC)

26

vi)	アニバーライト XAD-4 によるカラムクロマトグラフィー	26
vii)	ホルムアルデヒドの定量	27
viii)	E-Fp 及び E-Fo の合成	28

II	生体試料中の 6,7-ジヒドロキシ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン (DA-Fp) の高感度蛍光定量法	32
----	--	----

1.	DA-Fp の発蛍光体への誘導と $\text{NaIO}_4$ による DA-Fp の蛍光定量法	34
2.	DA-Fp の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と発蛍光	42
3.	生体試料中の DA-Fp の抽出	52
4.	生体試料中の DA-Fp の定量	58
5.	測定法の信頼性	65
6.	考察	69
7.	実験の部	76
i)	材料と測定機器	76

ii) H P L C の 機 器 77

iii) テトラヒドロイソキノリン体の  
合成 78

iv) 試料の採取 及び 保存 81

参考文献 83

謝辞 85

## 諸 言

カテコールアミンの主な代謝経路がほぼ完全に解明され、カテコールアミンの関与する疾患の病態解析や治療の基礎が築かれている。

しかし、今もなお、副次的な代謝経路により、<sup>1)2)3)</sup> 酵素的、あるいは非酵素的に生成する代謝物が見出されており、それか<sup>1)2)3)</sup>どのようなように機能し、いろいろな疾患とかがわるかという問題が、神経化学における重要な課題になりつつある。

最近、その一例として、カテコールアミンとアルデヒド類（アセトアルデヒド、3,4-ジヒドロキシフェニルアセトアルデヒド、フェニルピルビン酸、ホルムアルデヒドなど）との縮合物であるテトラヒドロイソキノリン体（Fig. 1）の *in vivo* での生成が認められ、各種の疾患との関連が疑われている。<sup>2)3)</sup> サルソリール（DA-Ap）、テトラヒドロハハベロリン（THP）は、ドーパミンの前駆物質である

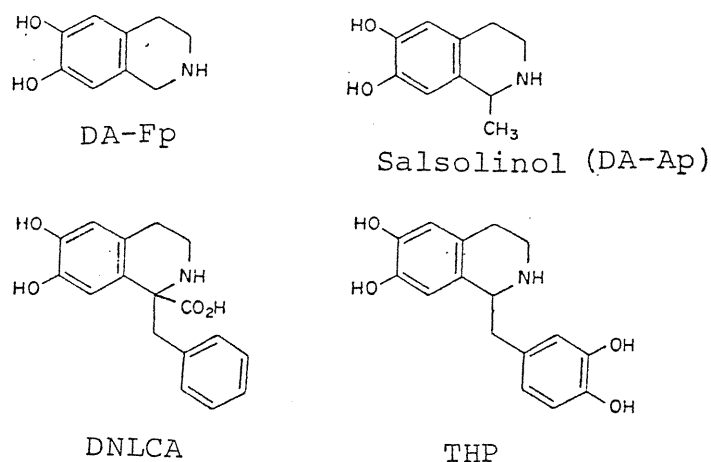


Fig. 1 Structures of Tetrahydroisoquinolines

レド-110の投与、エチルアルコールを摂取  
 した、ヒト尿中<sup>4)5)</sup>、あるいは動物臓器<sup>6)</sup>な  
 に検出され、それらが有する false transmitter と  
 しての作用<sup>2)3)</sup>や、モルヒネ類似の作用<sup>7)</sup>から、アル  
 コール症における精神症状や嗜癖性の原因物  
 質として、また、フェニルケトン尿症の患者  
 尿中に検出された3'4'-デオキシノルロ-ダ/  
 ソリン-1-カルボン酸(DNLCA)<sup>8)</sup>はフェニルケ  
 トン尿症における分裂様症状の発現物質とし  
 て想定されている。また、6,7-ジヒドロキ  
 シ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン(DA-Fp)  
 の生成がアルコール摂取時<sup>10)</sup>、あるいは、脳



由葉酸代謝<sup>11)</sup>と関連して、予想されること、さらに、これが、カルソリノールと同様 false transmitter<sup>2) 3)</sup>としての作用を有することから、アルコール摂取後の不快感や葉酸代謝異常に起因する分裂病の一因になるのではないかと考えられている。<sup>10) 11)</sup> これらテトラヒドロイソキリニン体はいずれも体内成分を反応基質として生成しうるものである。その生理的な生成にも興味がもたれるが、これまでの研究は、カテコールアミン、あるいはアルデヒド類の一方が過剰になって病的にテトラヒドロイソキリニン体が生成することと主眼がふかれ、生理的狀態での生成に関する研究は怠られていた。

一方、著者はカテコールアミン類のラジカイルム/アッセイ法を研究している過程で、そのアッセイ緩衝液中、緩やかな条件で、低濃度のエピネフリンが未知の变化をすることを発見した。そのことと端を発し、その变化物がエピネフリンとホルムアルデヒドとの縮

合物であるテトラヒドロイソキリリン体であり、<sup>11)</sup> エピネフリン抗原を投与して得られた、ある家兎の抗血清に高い親和性を有することを明らかにした。そのような抗血清が得られた理由の一つとして、家兎に免疫後、抗原上のエピネフリン部分が体内に存在するホルムアルデヒドと反応し、テトラヒドロイソキリリン体になることが考えられた。

これらのことから、著者は生理的狀態において生成しうるテトラヒドロイソキリリン体として、カテコールアミンとホルムアルデヒドとの縮合物に注目した。ホルムアルデヒドは、他のアルデヒド類に比べ、カテコールアミンとの反応性が高く、<sup>12)</sup> また、体内にその前駆物質となる成分が存在することから、<sup>13)</sup> 生理的に縮合物を生成する可能性は大きいと思われる。しかも、前述のようにな、疾患時におけるその生成が注目されており、それらを生体試料中に検出する意義は大きいと思われる。

カテコールアミンとホルムアルデヒドとの  
 縮合物であるテトラヒドロイソキノリン体の  
 比較的感度の高い分析法として、ガスクロマ  
 トグラフ<sup>14)</sup>、ガスクロマトグラフ<sup>15)</sup>・マ  
 ススペクトロメトリ<sup>15)</sup>、そして、電気化学的  
 検出による高速液体クロマトグラフ<sup>16)</sup>を用  
 いた方法が開発されており、ドーパミンを投与  
 したラット尿中に、DA-Fpを検出したという  
 報告<sup>16)</sup>もある。しかし、これらの方法は、生  
 理的状態のテトラヒドロイソキノリン体を検  
 索するには感度も十分とはいえず、また、試  
 料やそれを扱う器具などに存在するホルムア  
 ルデヒドによるア-ティファクトの生成を考  
 慮していないため、信頼性に欠ける。

そこで、著者は、この種のテトラヒドロイ  
 ソキノリン体の高感度で信頼性の高い分析法  
 の開発をめざした。分析法の開発にあたっ  
 ては、ドーパミンが脳内に比較的多く存在し  
 尿中にも多く排泄される<sup>17)</sup>ことから、対象物質  
 をドーパミン由来のDA-Fpとした。

なお、本論文は、このDA- $T_p$ の高感度蛍光分析法に関する研究を中心におくが、そのきっかけになったエポネフリンの未知の変化に関する研究を前半部 I に記載した。

# I. イムノアッセイ条件におけるエピネフリンの未知の変化

当教室の三輪<sup>(18)(19)(20)</sup>らは Chart 1 に示すようにして調製したカテコールアミン抗原を用いて、家兎を免疫し、エピネフリン あるいは ノルエピネフリンに対して特異的な抗血清を得ているが、著者は、そのエピネフリン抗原を用いて得たある抗血清が、エピネフリンの変化物に対して高い親和性を示すことを見いだした。そこで、この現象の詳細について検討した。

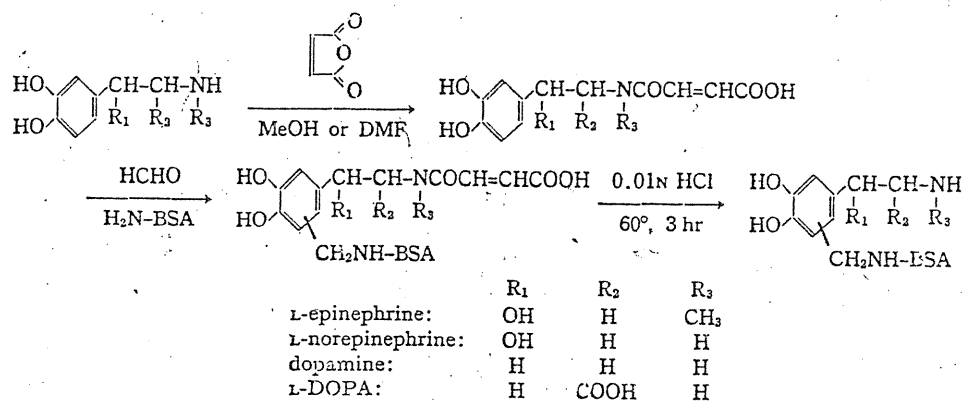


Chart 1. Procedure for Conjugation of the Haptens with BSA

# I-1. エピネフリンの未知の変化及びその変化物の同定

エピネフリン抗原を家兎に免疫して得られたある抗血清と、 $^3\text{H}$ -エピネフリンとの結合の時間経過を調べると、Fig. 2 の○が示すように、平衡に達するまでに10時間以上を要した。しかし、あらかじめの $^3\text{H}$ -エピネフリンをアスコルビン酸を含んだ緩衝液中、 $37^\circ$  14時間イン

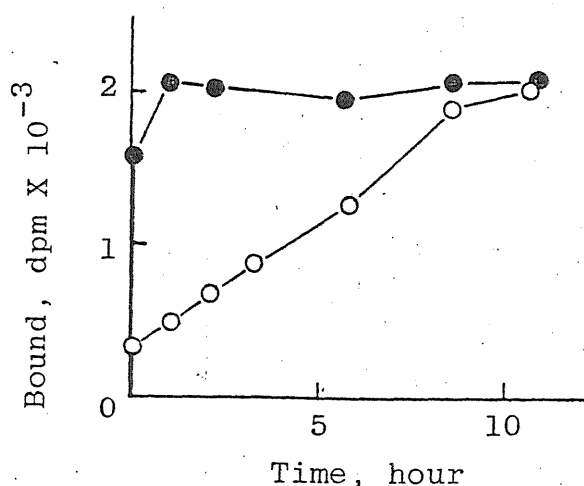


Fig. 2 Time Course of the Reaction of  $^3\text{H}$ -Epinephrine with the Antiserum

- :  $^3\text{H}$ -Epinephrine was used.
  - :  $^3\text{H}$ -Epinephrine ( $1 \times 10^{-8}$  M) preincubated in the buffer (0.1 M phosphate containing 10 mM ascorbic acid, pH 7.0) was used.
- 300-fold diluted antiserum was used.

キューバーシェンしておくと、その結合は  $\rightarrow$  が示すようにすみやかに平衡に達した。このことからこのインキューションにより  $^3\text{H}$ -エピネフリンが、何らかの変化を受けていること、そして、この胚血清が未知の変化物に親和性をもっていることが示唆された。

そこでこの変化物の性質を調べてみた。先の条件でインキューションした  $^3\text{H}$ -エピネフリンをアンバーライト CG-50 カラムで分

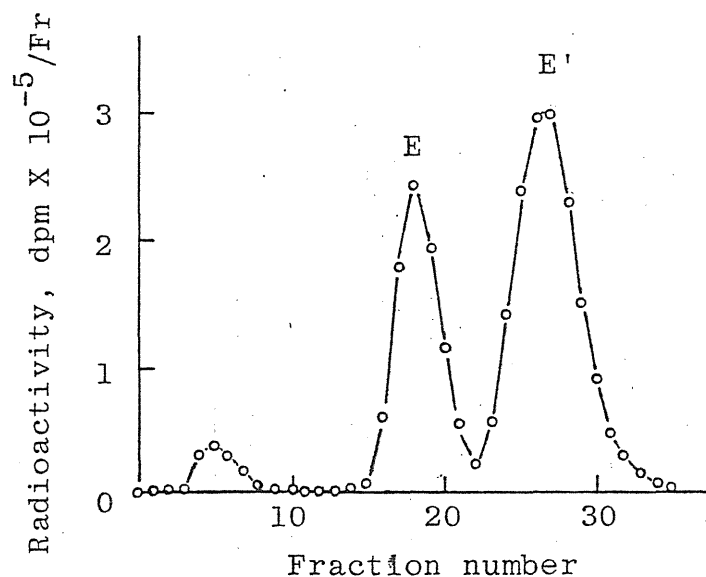


Fig. 3 Chromatogram of Degenerated product of  $^3\text{H}$ -Epinephrine on Amberlite CG-50

The catecholamine fraction obtained from 25 ml of the preincubation solution in Fig. 2 was used as a sample.

析すると Fig. 3 のように3つの放射能のピークが認められた。最初のピークはアドレノクロームのようなエピネフリンが酸化して生ずる化合物によるものと思われ、二番目のピークはエピネフリンそのものであった。そして、三番目のピークが先の抗血清に親和性をもっていた。そこでこの変化物画分の成分をE'と名づけた。E'はアスコルビン酸のかわりに、抗酸化剤としてL-システイン、 $\times$ タ重亜硫酸ソーダを用いた場合、あるいは、イオン交換樹脂をする際に緩衝液を窒素置換して密封した場合には生成しなかった。また、 $O_2$ 置換では生成が増加した。これらのことから、この変化に、アスコルビン酸と空気中の酸素が必要であることが示唆された。

Fig. 3 において分離されたE'を分取し、HPLCで分析するとFig. 4に示すように2成分に分離された。そこでそれらをE-1、E-2と名づけた。E-1とE-2はアニバーライトXAD-4によるカラムクロマトグラフで



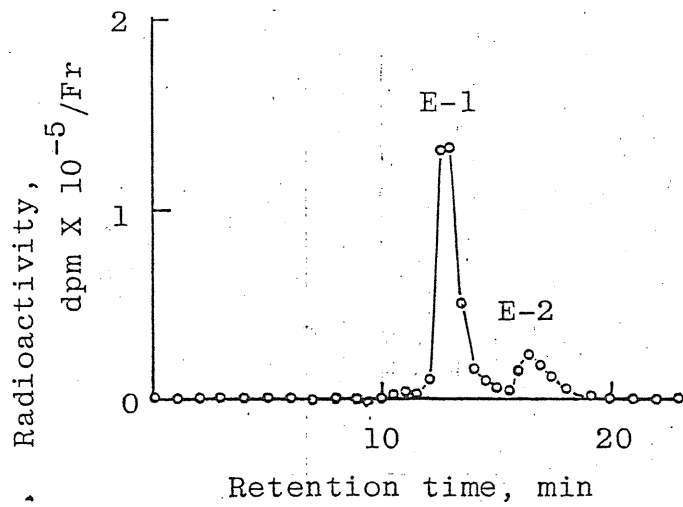


Fig. 4 Chromatogram of  $^3\text{H-E'}$  on Hitachi Gel 3011-C (HPLC)

The fractions (No. 23 - 30) in Fig. 3 were collected, and used as a sample after desalting by boric acid gel.

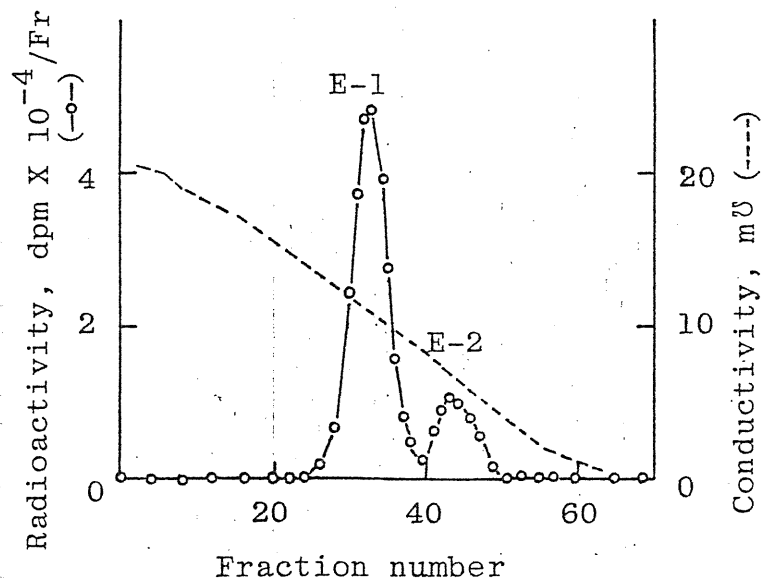


Fig. 5 Chromatogram of  $^3\text{H-E'}$  on Amberlite XAD-4

によっても Fig. 5 に示すように分離された。

次いで、 $E'$  を以下のような条件で大量調製した。： L-エピネフリン重酒石酸塩 ( $2 \times 10^{-4} M$ ) と L-アスコルビン酸 ( $1 \times 10^{-2} M$ ) を 1 l の 0.1 M リン酸緩衝液, pH 7.0, に溶かし、 $60^\circ$ , 3 時間、95%  $O_2$  - 5%  $CO_2$  ガスを通してインキュベーションした。エピネフリンの濃度が高いほど収率が下がったため、数%の収率が得られる  $2 \times 10^{-4} M$  を用いた。アスコルビン酸濃度は高いほど若干収率は増したが、あまり高濃度になるとポウ酸樹脂への  $E'$  の吸着が減少したので、 $1 \times 10^{-2} M$  とした。温度を上げると  $E'$  の生成速度ははやくな、たが副反応が強くなり現れたので、反応条件は  $60^\circ$ , 3 時間とした。

インキュベーションした反応液を室温に冷やしたのち、アスコルビン酸に由来する着色物質を除去するため、ダウエックス 1×8 カラムに通した。通過液をポウ酸樹脂を通して脱塩し、溶出されたカテコールアミン画分を、ア

ンバーライト CG-50 カラム ( $1.6 \times 30 \text{ cm}$ ) で分離した。得られた E' 画分は フォールしたのち、

アニバーライト XAD-4 カラム クロマトグラフ ( $1.6 \times 25 \text{ cm}$ ) で E-1 と E-2 に分離した。

それぞれの画分を脱塩後濃縮し 白色粗結晶

を得た。最終的に 12 L の反応液から E-1,

E-2 の粗結晶 それぞれ  $3 \text{ mg}$  (収率  $0.4\%$ ) と

$1 \text{ mg}$  (収率  $0.1\%$ ) を得た。

E-1 及び E-2 はカテコールに特異的な Doty 試薬<sup>(19)</sup> に陽性であり、また、ボウ酸樹脂にも吸着することから、カテコール構造はそのまま残っていると思われた。また、重水中の

$^1\text{H-NMR}$  の結果から、それぞれ、N-メチル基のプロトン、ベンゼン環の 2 つのプロトン、そして、ジエミチルプロトン = プロトン = スピーン結合を示す 2 組のプロトンの存在が示唆された。

可能な構造として Chart 2 に示すアトラクトロイノキノリン体 (E-Fp 及び E-Fo) が考えられた。それら合成報告例がなかった。

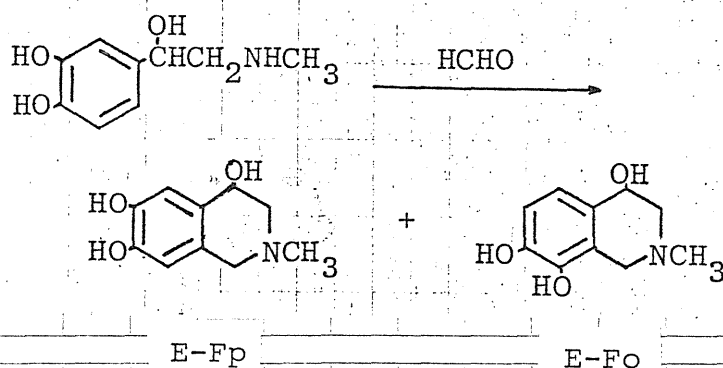


Chart 2 Reaction of Epinephrine with Formaldehyde

ために、エピネフリンとホルムアルデヒドから、新規に合成した (I-5-VIII)。得られた 2 種の縮合物のうち、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトルで、

ベンゼン環プロトンのシフト領域に、p 位の 2 つのプロトンの存在を示す 2 本のシグナルがみられたものを E-Fp と同定した。もう一方は、ベンゼン環に 2 つのプロトンが存在するとは、また、アセチル化したものに  $\text{CDCl}_3$  中で  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルをとると、o-位のスピニ結合 ( $J = 8.6 \text{ Hz}$ ) を示すシグナルがみられたことから、E-Fo と同定した。

そして、Table I に示す諸性値、ならびに  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルから E-1 を E-Fp、E-2 を E-Fo と同定した。

Table I. Identification of Degenerated Products from E with Tetrahydroisoquinolines

Product	$^3\text{H-E-1}^{\text{a)}$	E-1	E-Fp	$^3\text{H-E-2}^{\text{a)}$	E-2	E-Fo
Chromatography						
Hitachi gel 3011-C (HPLC) $t_{\text{R}}^{\text{b)}$ , min	12.8	12.8	12.8	16.5	16.5	16.5
Silica gel (TLC), Rf BuOH:AcOH:H <sub>2</sub> O=3:1:1	0.38	0.37	0.37	0.44	0.44	0.44
Electrophoresis <sup>c)</sup>						
Cellulose acetate, Rm						
pH 8.6		0.2	0.2		0.2	0.2
pH 5.0		1.0	1.0		1.0	1.0
UV-spectrum $\lambda_{\text{max}}$ , nm		282.5	282.5		279.0	279.0
Color with						
Doty's reagent		purple	purple		violet	violet
Gibbs reagent		blue	blue		blue	blue

a)  $^3\text{H-E-1}$  and  $^3\text{H-E-2}$  in Fig. 4 were collected , concentrated and used

b) retention time

c) Electrophoresis was carried out for 10 min at 1 mA/cm. The electrolytes were 0.07 M veronal-sodium veronal buffer, at pH 8.6, and 0.1 M acetate-sodium acetate buffer, pH 5.0.

## I-2 変化物と抗血清との反応

$^3\text{H}$ -E $^{\circ}$ ネフリンとホルムアルデヒドを反応させたのち、日立ケル3011-CのHPLCにより分離し  $^3\text{H}$ -E-Fp 及び  $^3\text{H}$ -E-Fo を調製した。それらを用い、抗血清に対する結合能をミリポアフィルター法により  $4^{\circ}$ , 2時間の反応条件で比較すると Table II のようになつた。

そこで、その抗血清に最も高い結合能を有していた E-Fp について、その結合能の特異性を調べてみると Fig. 6 のようにかなり E-Fp に特異的であった。

Table II Binding Activity to Antiserum

Compound	Bound (B) (dpm)	Total (T) (dpm)	B/T (%)
$^3\text{H}$ -Epinephrine	430	9900	4.3
$^3\text{H}$ -E-Fp	1830	10200	17.9
$^3\text{H}$ -E-Fo	210	11000	1.9

1000-fold diluted antiserum was used. Reaction was carried out at  $4^{\circ}$  for 2 hours.

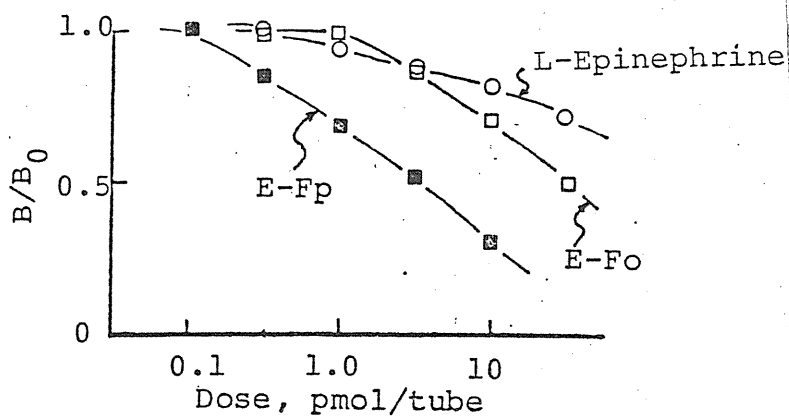


Fig. 6 Inhibition Curves of Binding of  $^3\text{H}$ -E-Fp to Antibody  
by E-Fp, E-Fo and L-Epinephrine

B: antibody-bound radioactivity

$B_0$ : B at zero dose

1000-fold diluted antiserum was used. Reaction was carried out at  $4^\circ$  for 2 hours. Total radioactivity(T) was 10200 dpm. B/T was 0.18.

## I-3 変化物の1位炭素の由来

イムノアッセイ緩衝液中のどの成分に E-1、E-2 の1位の炭素が由来するのかを明らかにする二を試みた。エピネフリンから E-1、及び E-2 への変化は何らかの成分からホルムアルデヒドが生成する結果おこるものと考え、また E' の生成にアスコルビン酸と空気の存在が必要なことから、空気と接触したアスコルビン酸溶液中に、ホルムアルデヒドが生成するかどうかを調べた。

ホルムアルデヒドの、比色あるいは蛍光定量はアスコルビン酸によって妨害されたのでホルムアルデヒドは2,4-ジニトロフェニルヒドラゾンとして HPLC により定量した。

Table III に示すように、インキュベーションしたアスコルビン酸溶液中、ホルムアルデヒドが検出された。そして、その生成は、空気との接触を必要とし、また、塩化銅=銅、塩化銅=鉄の添加により増強された。その



検出量は、アスコルビン酸のロットを変えたり、ナトリウム塩を用いてもほとんど変化しなかったから、ホルムアルデヒドの生成は、試薬中の不純物によるものではないと思われた。

Table III Formation of Formaldehyde in Ascorbic Acid Solution  
Incubated at 37° for 14 Hours

Sample	Air <sup>a)</sup>	HCHO Found, $\mu$ M
Water	+	ND <sup>d)</sup>
	-	ND
Buffer I <sup>b)</sup>	+	ND
	-	ND
Buffer II <sup>c)</sup>	+	0.5
	-	ND
+ 10 mM sodium metabisulfite	+	ND
+ 0.1 mM FeCl <sub>3</sub>	+	1.4
	-	0.3
+ 0.1 mM CuCl <sub>2</sub>	+	1.5
	-	0.2

a) -: A sample was enclosed in a 200-ml flask with a ground glass stopper during the incubation.

+: A sample was not enclosed.

b) 10 mM phosphate buffer, pH 7.0

c) 10 mM phosphate buffer containing 10 mM ascorbic acid, pH 7.0

d) ND: not detected,  $< 0.2 \mu$ M

## I-4 考察

中性溶液中、イスクルビン酸及び酸素の存在下、エピネフリンからテトラヒドロイソキノリン体 (E-Fp 及び E-Fo) が生ずることは I-1 の結果から示される。さらに I-2 の結果は用いた抗血清が、その一つである E-Fp に対する抗体を含んでいることを示している。

このような抗血清が得られた理由として、家兎に投与する際すでに、抗原上のエピネフリン部分が変化していた場合と、家兎体内で変化した場合とが考えられよう。紫橋<sup>21)</sup>としてホルムアルデヒドを用いているので、抗原調製の際、抗原上のエピネフリンの側鎖の保護基を除いたのちに、それが反応することが十分考えられるので、前者の可能性は大きいと思われる。しかし吉岡<sup>21)</sup>らが  $^{13}\text{C}$ -

NMR によりエピネフリン抗原を分析した結果によると、エピネフリンの N-メチル基の炭素のピークがスペクトル上に認めら

れ、蛋白質に結合してゐるエピネフリンのおお  
くは大きな自由度をもちながら存在する二  
が示唆されてゐる。また、 $\beta$ アリルアミン  
構造をもつものと反応するホルムアルデヒド  
が体内に存在する二を示唆する報告が数知  
<sup>22) 23) 24)</sup>  
くある。したがって、体内で損傷が変化する  
可能性も否定できない。もしそうである  
ならば、カテコールアミンとホルムアルデヒド  
との縮合物は false transmitter としての作用を  
有してあり、<sup>2) 3)</sup> また、ある種の疾患時にその  
縮合物の生成が疑われてゐるの<sup>9) 10)</sup>で、内生性の  
カテコールアミンが同様の変化をするものか  
どうかは、今後興味ある課題とならう。

本研究で明らかにしたテトラヒドロイソ  
キリリン体の生成にはアスコルビン酸と空気  
中の酸素が必要であり、また、同じ条件で  
アスコルビン酸溶液中にホルムアルデヒドが  
生ずる。さらにホルムアルデヒドは容易に  
エピネフリンと反応し (Chart 2) テトラヒド  
ロイソキリリン体を生成する二ことから、テト

テトラヒドロイソキノリン体の生成は、空気酸素によるアスコルビン酸の酸化を通して生ずるホルムアルデヒドとエピネフリンが反応しておこるものと思われる。

他のカテコールアミンであるノルエピネフリンやドーパミンもホルムアルデヒドと反応し、テトラヒドロイソキノリン体を生ずるので、それらもエピネフリンと同様の条件で変化するものと思われる。実際、3H-ノルエピネフリンを Fig. 2 に示す条件でインキベーションすることにより、アンバーライト CG-50 カラムクロマトグラフで変換物を確認している。

アスコルビン酸は、カテコールアミンに関連した酵素研究<sup>25)</sup>、結合実験<sup>26)</sup>、定量実験<sup>27)</sup>などに酸化防止剤として用いられているが、アスコルビン酸によるホルムアルデヒドあるいはテトラヒドロイソキノリン体の生成が実験結果に影響するかどうか、今後検討する必要があるだろう。たとえばアスコルビン酸を用

いたくとも、血清や臓器を用いた *in vitro* の実験では内在性のアスコルビン酸が結果に影響する可能性もある。さらに、このラットとイヌキリンへの変化は生理的 pH、生理的過度でないとことから、生体内でアスコルビン酸が関与しておる可能性もあり、興味深い。

## I-5. 実験の部

## i) 材料 / 及び 測定機器

L-イピネフリン重酒石酸塩 (牛井化学)  
 L-アスコルビン酸, L-アスコルビン酸ナトリ  
 ム塩 (関東化学), DL-イピネフリン (Sigma社)  
 を用いた。 DL-イピネフリン-[7- $^3\text{H}$ ] 重酒石  
 酸塩, (11.0 Ci/mmol) は New England Nuclear より購入  
 した。 他の試薬は特級品を用いた。 ジウ  
 酸樹脂 (Aldrich Chemicals 社), アンバー ライト  
 CG-50, type II, アンバー ライト XAD-4 (Rohm  
 and Haas 社) そして ダウイック ス 1X8 (Dow  
 Chemicals 社) を用いた。 日立ゲル 3011-C  
 は日製産業, 成田 彰 氏より提供と戴いた。

アンバー ライト XAD-4 は粉碎し 150 - 300  
 ミュー シュ の粒子としたものを, 本学, 荒川 義  
 弘氏より提供と戴いた。 結合実験用の試料  
 は, Bray's 溶液<sup>20)</sup>に溶解し, その放射能を 液  
 体シンチレーションカウンター (Packard 社  
 Model 3255 Tri-carb system on line programed)

で計数した。

$^1\text{H-NMR}$  はフーリエ変換  $\text{NMR}$  装置 (日本電子, FMN-FX100) により測定した。吸収スペクトルは分光光度計 (日本分光, UV1505) により測定した。融点は柳本製薬製のミクロ融点測定装置で測定した。

## ii) $^3\text{H}$ -エピネフリンの結合実験

アッセイはエピネフリンのラジオイムノアッセイ操作法<sup>20)</sup>に従って行なった。10 mM のアスコルビン酸を含んだ 0.1 M リン酸緩衝液で希釈した抗血清<sup>20)</sup> 及び  $^3\text{H}$ -エピネフリン (6000 dpm) をシリコン処理したガラスチューブに加え、 $37^\circ$  インキュベーションの後、反応液をミリポアフィルター (ミリポア社) で濾過した。そして、フィルターに吸着した抗体に結合している放射能を測定した。

## iii) ホウ酸樹脂を用いた分離

カテコールアミン画分は Higa<sup>28)</sup>らの方法を若干改良して得た。試料の十分の一容量の、0.1 M アスコルビン酸を含んだ 1 M リン酸緩衝液, pH 7.0, を試料に加え 1 N NaOH で pH を 7.0 に調整した。そして、その溶液をホウ酸樹脂のカラムにのせた。カラムの 20 倍容量の水で洗浄後、0.025 N 塩酸でカテコールアミン画分を溶出した。溶出液は 280 nm の吸光度、または Doty's 反応の呈色で検定した。

## iv) アニバーライト CG-50 によるカラムクロマトグラフィー

ホウ酸樹脂から溶出されたカテコールアミン画分を 40° で減圧乾固し、残渣を 10 mM アスコルビン酸を含んだ酢酸緩衝液, pH 6.1, 1.0 ml に溶解した。溶液はその緩衝液で平衡化したアニバーライト CG-50 のカラムにのせた。クロマトグラフィーの条件は Kirschner<sup>29)</sup>らの方法に従った。



v) 日立ゲル 3011-C による高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

協和精密社製 ミニマイクローポンプ, KSU-16H, ミツミ科学産業社の LDC UVモニター, ST-1205, そして 全多孔性陽イオン交換樹脂である日立ゲル 3011-C を充填したガラス管 ( $2 \times 500 \text{ mm}$ ) から成るクロマトグラフを用いた。カラム温度は  $45^\circ$  に保った。溶離液は  $0.4 \text{ M}$  酢酸緩衝液,  $\text{pH } 5.0$ , 流速は  $0.50 \text{ ml/min}$  とした。試料は  $50 \mu\text{l}$  用マイクローシンジで注入した。

vi) アニバーライト XAD-4 によるクロマトグラフィー

試料に同容量の食塩で飽和した  $0.01 \text{ N}$  塩酸溶液を加え、それを  $20\%$  食塩 -  $0.01 \text{ N}$  塩酸で平衡化したアニバーライト XAD-4 カラム ( $1.0 \times 20 \text{ cm}$ ) にのせた。溶離は塩濃度を徐々に下げた勾配溶離法 ( $20 \sim 0\%$  食塩 -  $0.01 \text{ N}$  塩酸) により Fig. 5 に示すように行なった。溶出液は前記 HPLC でモニターした。

## vii) ホルムアルデヒドの定量

ホルムアルデヒドは 2,4-ジニトロフェニル  
 ドラジン (DNP) と反応させ、生成物を抽出  
 後 HPLC により定量した。反応及び抽  
 出は日野らの方法<sup>30)</sup>に若干改良を加え行なった。  
 試料溶液 100 ml に濃塩酸 5.0 ml, 2N 塩酸の 0.01  
 % DNP 溶液 10 ml さらに内標としてトリフェ  
 ニル 50 µg を加えたのち、生成物を四塩化炭  
 素により 2 回抽出 (20 ml, 10 ml) した。有機  
 層を合わせ、1N 塩酸 20 ml で洗淨後、無水硫酸  
 ナトリウムで水分を除去した。蒸過後 45°  
 で減圧乾固し、残渣を 2 ml のジクロルメタン  
 にとかした。その 10 µl を HPLC で分析した。  
 クロマトグラフの条件は Mansfield らの方  
 法<sup>31)</sup>に従った。Licrosorb SI-100 (Merck 社)  
 4 × 250 mm のカラムを用い、カラム温度は 25°  
 とした。この方法によるホルムアルデヒド  
 の検出限界は 0.1 µM 濃度であった。

viii) 4,6,7-トリクロロキシニ-2-キフル-1,2,3,4-  
 テトラクロロイソキリリン (E-Fp) 及び  
 4,7,8-トリクロロキシニ-2-キフル-1,2,3,4-  
 テトラクロロイソキリリン (E-Fo) の合成

E-Fp・塩酸塩: DL-エポネフリン 1g 及び  
 35%ホルムアルデヒド 0.5ml を 5.0ml のメタノール  
 に加え、その懸濁液を室温で一時間攪拌し  
 たのち濾過し、残渣を冷メタノールで洗浄し  
 た。残渣を 1ml の 6N塩酸にとかしたのちメ  
 タノールを加え、E-Fp塩酸塩の粗結晶を得た。  
 メタノールからの再結晶により針状結晶 (300  
 mg, 23.7%) を得た。 mp 200-201°

Anal Calcd for  $C_{10}H_{13}O_3N$  C; 51.84, H; 6.09  
 N; 6.05 Found C; 51.77, H; 6.08 N; 5.92

$^1H$ -NMR (重水中 2% 溶液)  $\delta$ : 3.09 (3H, s, N-CH<sub>3</sub>)  
 3.40-3.80 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-), 4.06-4.50 (2H, m, -CH<sub>2</sub>-)  
 4.95 (1H, m, -CH(OH)-), 6.69 (1H, s, Ar-H) 6.91  
 (1H, s, Ar-H). UV  $\lambda_{max}^{0.1N HCl}$  nm ( $\epsilon$ ); 282.5 (2650)

E-Fo はエピネフリンとホルムアルデヒドの副生成物であろうとされている<sup>32)</sup>が、縮合反応の性質など今までほとんど調べられていないので、E-Fp, E-Fo の生成率の pH 依存性を調べた (Fig. 7)。(E-Fo/E-Fp + E-Fo) の生成比は  $^3\text{H}$ -エピネフリンをホルムアルデヒドと反応後日立ゲル 3011-C の HPLC で分離し、それぞれの排出液を分取、放射能を計数、計算した。

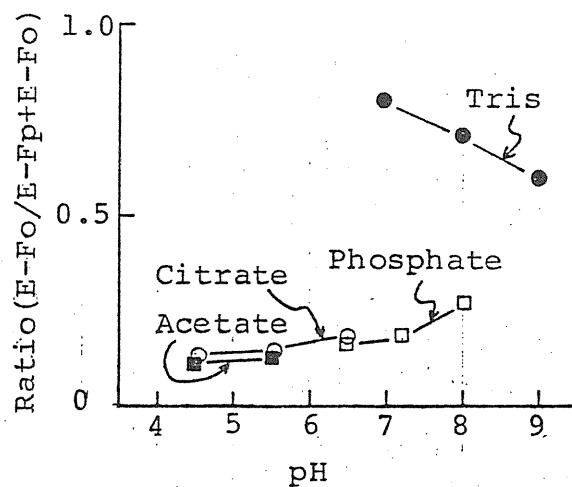


Fig. 7 pH Dependency of the Formation of E-Fp and E-Fo in the Reaction of DL-Epinephrine with Formaldehyde

$^3\text{H}$ -Epinephrine ( $1 \times 10^{-4}$  M) reacted with formaldehyde ( $1 \times 10^{-3}$  M) in 0.1 M of each buffer at  $28^\circ$  for 1 hour was separated on Hitachi gel 3011-C column (HPLC), and the radioactivity of E-Fp and E-Fo were measured. Ratio was calculated from these data.

酢酸, クエニ酸, リン酸緩衝液中では pH 4  
 ~ 8 の範囲で E-Fo の生成率は 20 % 以下であ  
 った。しかし、理由は不明であるが、トリス  
 緩衝液中では pH 7.0 で生成率は約 80 % であ  
 った。そこで、E-Fo はトリス緩衝液を用いて  
 調製した。

E-Fo・塩酸塩： 35 % ホルムアルデヒド  
 1.0 ml を 10 mM アスコルビン酸を含んだ 0.1  
 M トリス緩衝液, pH 7.0, 100 ml に加え、次に  
 6 N 塩酸 2.0 ml に溶解して DL-イソネアリン 0.5  
 g を加えた。室温で 1 時間攪拌後、25 g の  
 食塩を加え溶解したのち、アムバーライト  
 XAD-4 カラムにより E-Fo を E-Fp から分離した。  
 E-Fo のみを含む画からボウ酸樹脂により得た  
 カテコールアミン画分を乾固した。E-Fo を  
 1 N 塩酸及びアセトンにより再結晶し、  
 針状結晶 (51 mg, 8.1 %) を得た。mp 200 -  
 201° (180° から着色)。

Anal Calcd for  $C_{10}H_{13}N_1O_3$  ; C ; 51.84

$H; 6.09, N; 6.05.$  Found  $C; 51.74, H;$   
 $5.98, N; 5.95.$   $^1H-NMR$  ( 重水中 2%  
 溶液 )  $\delta$  :  $3.15$  (  $3H, s, N-CH_3$  ),  $3.40-3.75$  (  $2H,$   
 $m, -CH_2-$  ),  $3.97-4.75$  (  $2H, m, -CH_2-$  ),  $5.02$  (  $1H,$   
 $m, -CHOH-$  ),  $6.96$  (  $2H, s, Ar-H$  ).  $UV_{max}^{0.1N HCl}$   
 $mm(\epsilon)$  ;  $279(2460).$

## II 生体試料中 6,7-ジヒドロキシ-1,2,3,4- テトラヒドロイソキノリン(DA-Fp)の高 感度蛍光定量法

蛍光検出は目的物質を量子収率の高い蛍光体に導くことができれば高感度化が可能であり、蛍光反応が選択的であれば、特に高速液体クロマトグラフィ-に組み込むことで、高感度ではあるが選択性の乏しいガスクロマトグラフィ-の電子捕捉検出や高速液体クロマトグラフィ-の電気化学的検出に比べ、より信頼性の高い分析が期待できる。また、ガスクロマトグラフィ-・マススペクトロメトリ-のように高価な装置を必要としないので研究手段としての有用性が高い。

そこで DA-Fp の高感度分析法の開発をめぐりにあたり、高感度で選択性の高い蛍光反応を検索した。そして、検索の結果見出された  $\text{NaIO}_4$  による DA-Fp の蛍光反応(II-1)を高速液体クロマトグラフィ-に導入し(II-2)

生体試料中の DA-Fp の分析法を確立した (I-3)。



## II-1 DA-Fp の発蛍光体への誘導と $\text{NaIO}_4$

### による DA-Fp の蛍光定量法

#### i) DA-Fp の発蛍光体への誘導

発蛍光体への誘導は DA-Fp 分子の官能基の  
蛍光検出試薬に基づいた蛍光検出法と、従来  
知られてゐる テトラヒドロイソキノリン体  
を発蛍光体へ導く方法とついで検討した。

前者として は 二級アミン, フェノール, カ  
テコール等に対する方法が考えられるが、二  
級アミン, フェノールについては感度の良い  
検出試薬が知られてゐたため、カテコール  
の検出試薬として知られるエチレンジアミン  
についでのみ検討し、また、後者として は、  
テトラヒドロイソキノリン体を経由する蛍光  
反応として カテコールアミンから、6,7-ジ  
ヒドロキシ-3,4-ジヒドロイソキノリン体へ、  
ホルムアルデヒドを用いて酸化的に誘導する  
方法<sup>33)</sup>が 微量のカテコールアミンの組織化学  
的検出法として知られてゐるので、種々の酸

化剤 (  $\text{NaIO}_4$ ,  $\text{NaIO}_3$ ,  $\text{NaBrO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{I}_2$  ) を作用させ、類似の機構により蛍光体にならないかどうかを検討した。

その結果、リ-酸緩衝液中、 $\text{pH } 7.0$ ,  $\text{NaIO}_4$  により Fig. 8 に示すような非常に強い蛍光

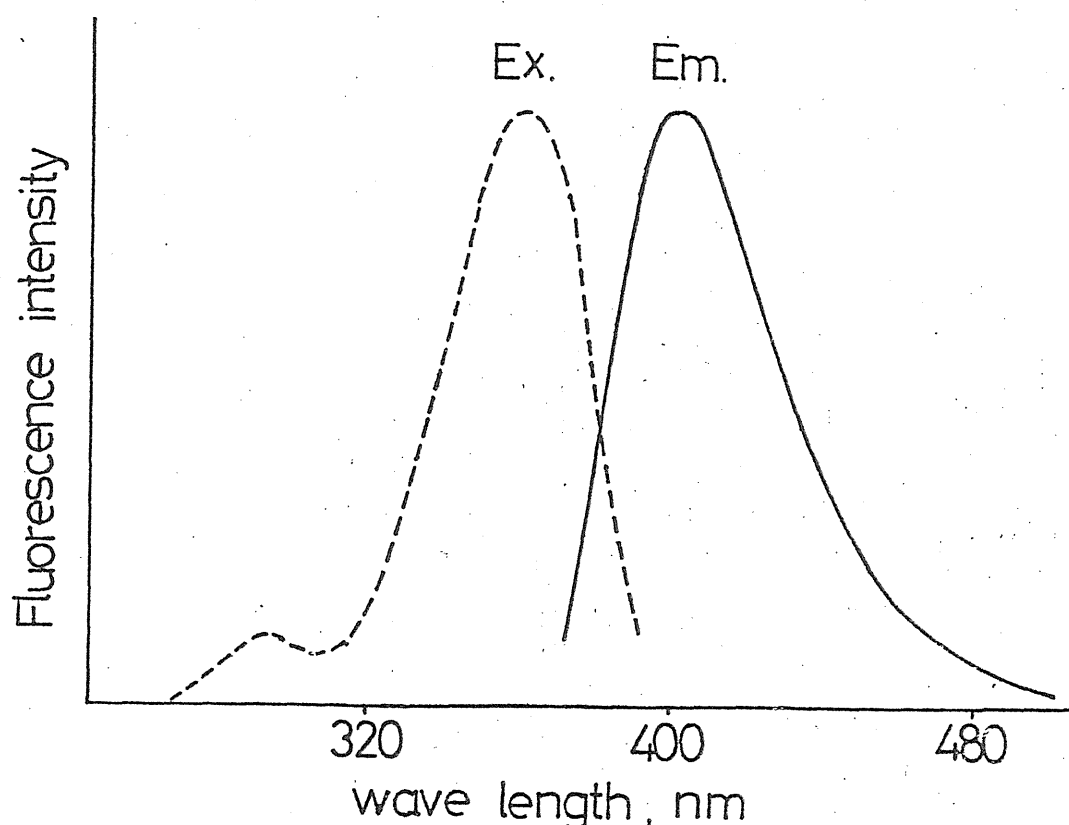
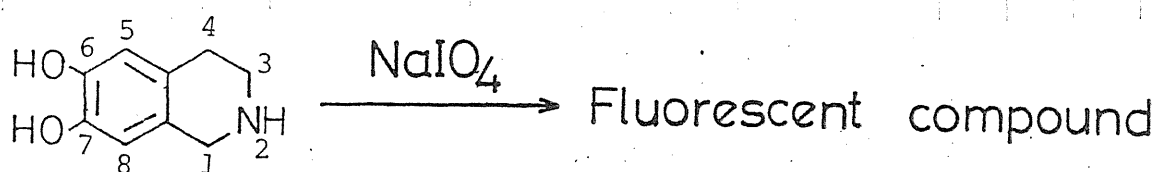


Fig. 8 Excitation and Emission Spectra of DA-Fp Reacted with  $\text{NaIO}_4$

( $\lambda_{ex} = 362 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 404 \text{ nm}$ ) が観測された。

イソレンジアミン (25% 溶液,  $60^\circ$ , 30分加温) によっても発蛍光体 ( $\lambda_{ex} = 400 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 500 \text{ nm}$ ) となったが、その強度は  $\text{NaIO}_4$  の場合の三十分の一以下でありました。他の酸化剤では、反応 pH (5.0, 7.0, 9.0), 反応温度 ( $25^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$ ) を変えても至適励起、発光波長におい、強度は  $\text{NaIO}_4$  の場合の五十分の一以下でありました。

## ii) $\text{NaIO}_4$ による DA-Fp の蛍光定量法

DA-Fp の定量操作法: シリコニル処理を施したガラス試験管に試料 0.1 ml, さらに 1 mM  $\text{NaIO}_4$  - 0.1 M リン酸緩衝液, pH 8.0, を 3.9 ml 加えて  $37^\circ$ , 15分加温後、室温にもどした。うち、蛍光強度 ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 362/404$  or  $355/420 \text{ nm}$ ) を測定する。

用手法により、 $\text{NaIO}_4$  による DA-Fp の発蛍光の性質を下記の通りに調べ、上記定量条件を確立した。

発蛍光の pH 依存性を調べると Fig. 9 に示すように蛍光強度はリニ酸緩衝液中、pH 8.0 以上で最大となり、トリス、グリシン緩衝液中では緩衝剤が試薬と反応するためか、反応が

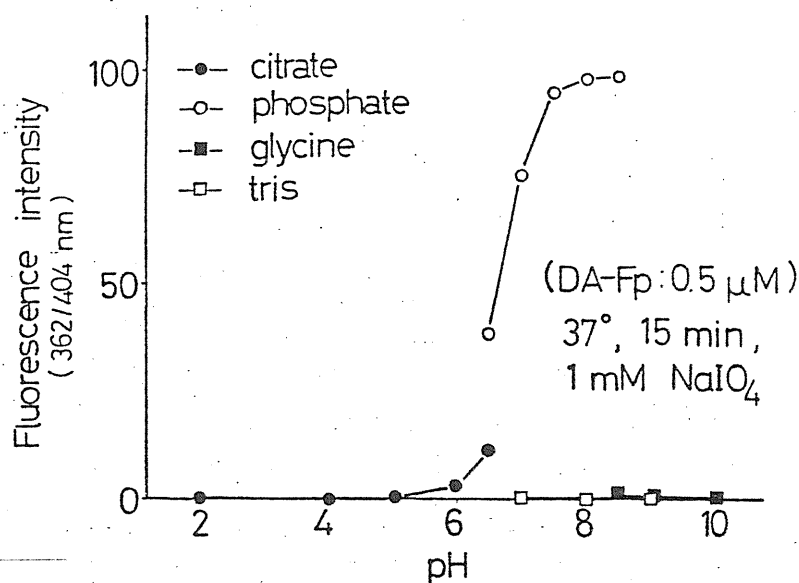


Fig. 9 Dependence of the Fluorescence Reaction upon pH

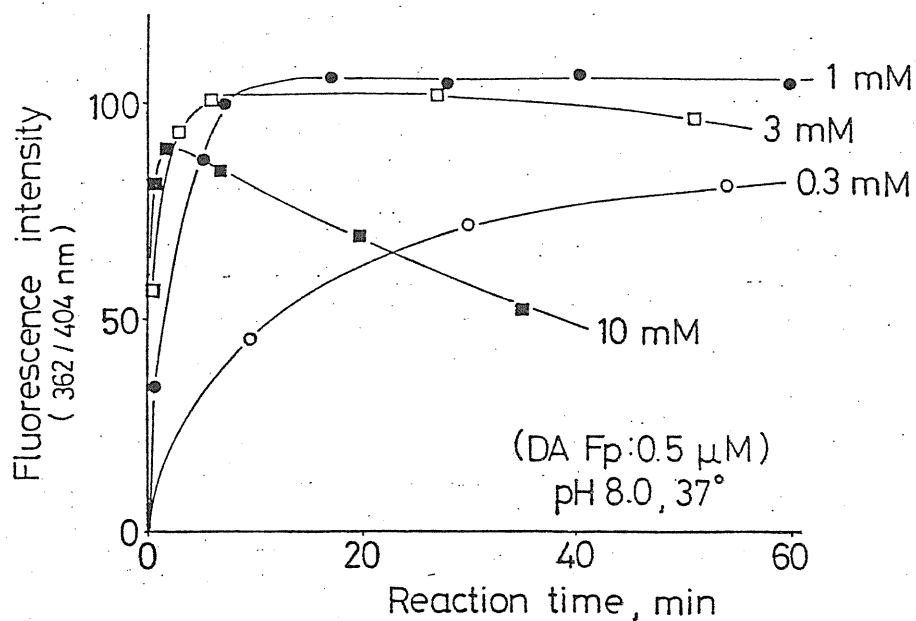


Fig. 10 Effect of  $\text{NaIO}_4$  Concentration and Reaction Time on the Reaction

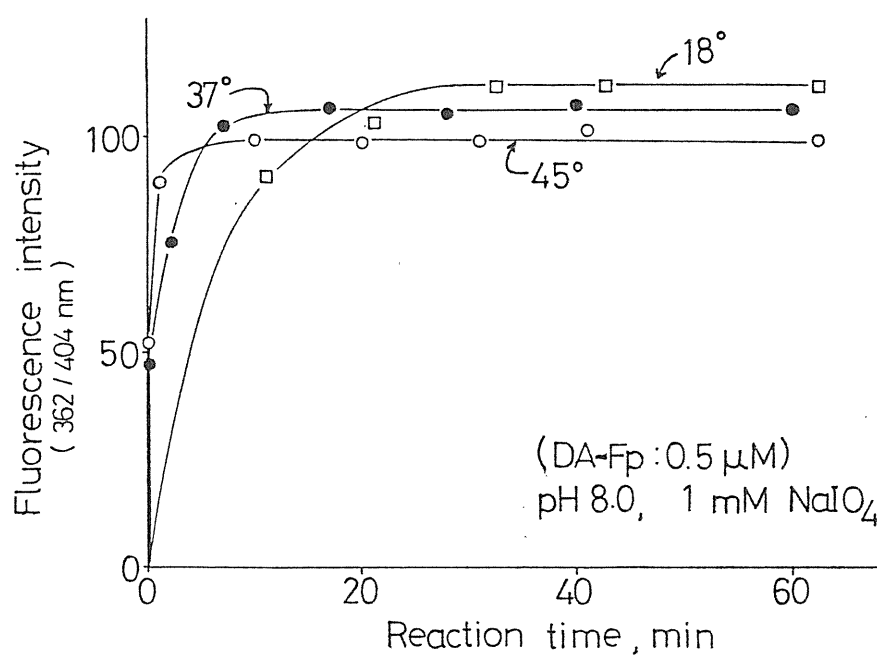


Fig. 11 Time Course of the Reaction at Various Temperature

妨害され蛍光は観測されなかった。 Fig. 10  
 に示すように、 $\text{NaIO}_4$  濃度と反応時間の影響  
 をみると  $\text{NaIO}_4$  が  $10 \text{ mM}$  では反応速度は大き  
 くなるが時間とともに蛍光強度の減少がみられ  
 比較的すみやかに蛍光物質が生成し、安定に  
 存在するのは  $1 \sim 3 \text{ mM}$  の範囲であった。ま  
 た Fig. 11 に示すように温度は  $18^\circ \sim 45^\circ$  の範  
 囲では高いほど反応速度は大きくなるが、最  
 大蛍光強度にはほとんど影響しなかった。

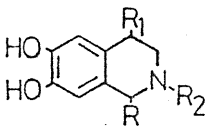
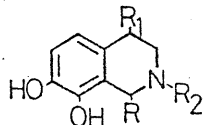
そこで、定量操作法に従い反応の特異性を  
 みると、Table IV に示すように、カテコール  
 アミン、その主代謝物、また エピネフリン  
 、1-ルエピネフリンに由来するテトラヒドロ  
 イソキノリンに比べ、DA-Fp の蛍光は非常に  
 つよく、この反応がかなり DA-Fp に特異的で  
 あることがわかった。

特異性の実験で比較的つよい強度を示した  
 3種のテトラヒドロイソキノリン体について  
 同様の条件で検量線を書くと Fig. 12 に示すよ  
 うに試験管あたり、DA-Fp では  $2 \text{ pmol}$  から

Table IV Relative Fluorescence Intensity(RFI) of Various Compounds in the Reaction

Compound	RFI		RFI
DA-Fp	100	DL-Metanephrine	0.14
En-Fp	18	DL-Normetanephrine	0.14
DA-Ap	6.5	3-Methoxytyramine	0.01
DL-NE-Fp	0.54	DL-Vanilmandelic acid	0.89
DL-E-Fp	0.16	Homovanillic acid	0.09
DL-NE-Fo	0.36	DL-3,4-Dihydroxyphenyl-	
DL-E-Fo	0.01	mandelic acid	0.75
Dopamine	0.30	3,4-Dihydroxyphenyl-	
L-Norepinephrine	0.27	acetic acid	0.18
L-Epinephrine	0.08	6-Hydroxy-2-methyl-	
L-DOPA	0.01	1,2,3,4-tetrahydro-	
		isoquinoline	0.01

## Abbreviations :

Compound	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R	Structure
DA-Fp	H	H	H	 <p>type p</p>
En-Fp	H	CH <sub>3</sub>	H	
DA-Ap	H	H	CH <sub>3</sub>	
NE-Fp	OH	H	H	
E-Fp	OH	CH <sub>3</sub>	H	
NE-Fo	OH	H	H	 <p>type o</p>
E-Fo	OH	CH <sub>3</sub>	H	

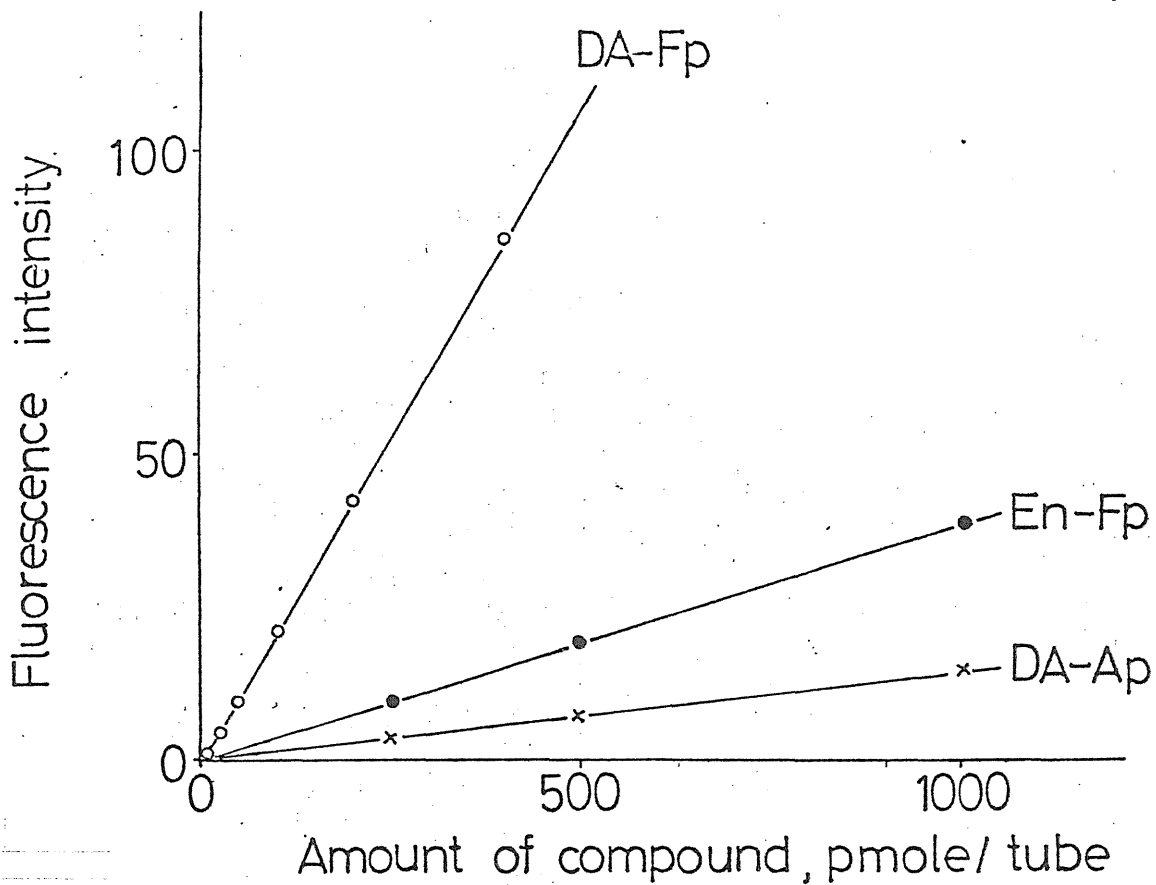


Fig. 12 Working Curves for DA-Fp, En-Fp and DA-Ap

2nmol まで原点を通る直線となった。また En-Fp, DA-Ap についても原点を通る直線となり、用手法により、これらの物質が高感度で定量できることがわかった。



## II-2 DA-Fp の高速液体クロマトグラフィーと発蛍光

前節の用手法が 共存するカテコールアミン類により若干妨害をうけ、直接生体試料に応用できなかったのので、DA-Fp とカテコールアミン類を分離して検出するため、この反応を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) に応用した。HPLC に応用すると、目的成分と他成分が分離されることによる選択性の向上以外に、ポストカラム反応にした場合、フローシステムにより反応条件を一定にできるので再現性がよくなることが期待できる。

そこで、本蛍光反応をポストカラム反応として HPLC にオンラインで組み込み、Fig. 13 のような装置を作成した。カラムにより分離された試料を、検出器内で pH 9.1 ~ 9.3,  $\text{NaIO}_4$  濃度 1.5 ~ 1.7 mM とするよう送液した反応液と混合し、反応コイルを通過後、生じる蛍光を検出した。

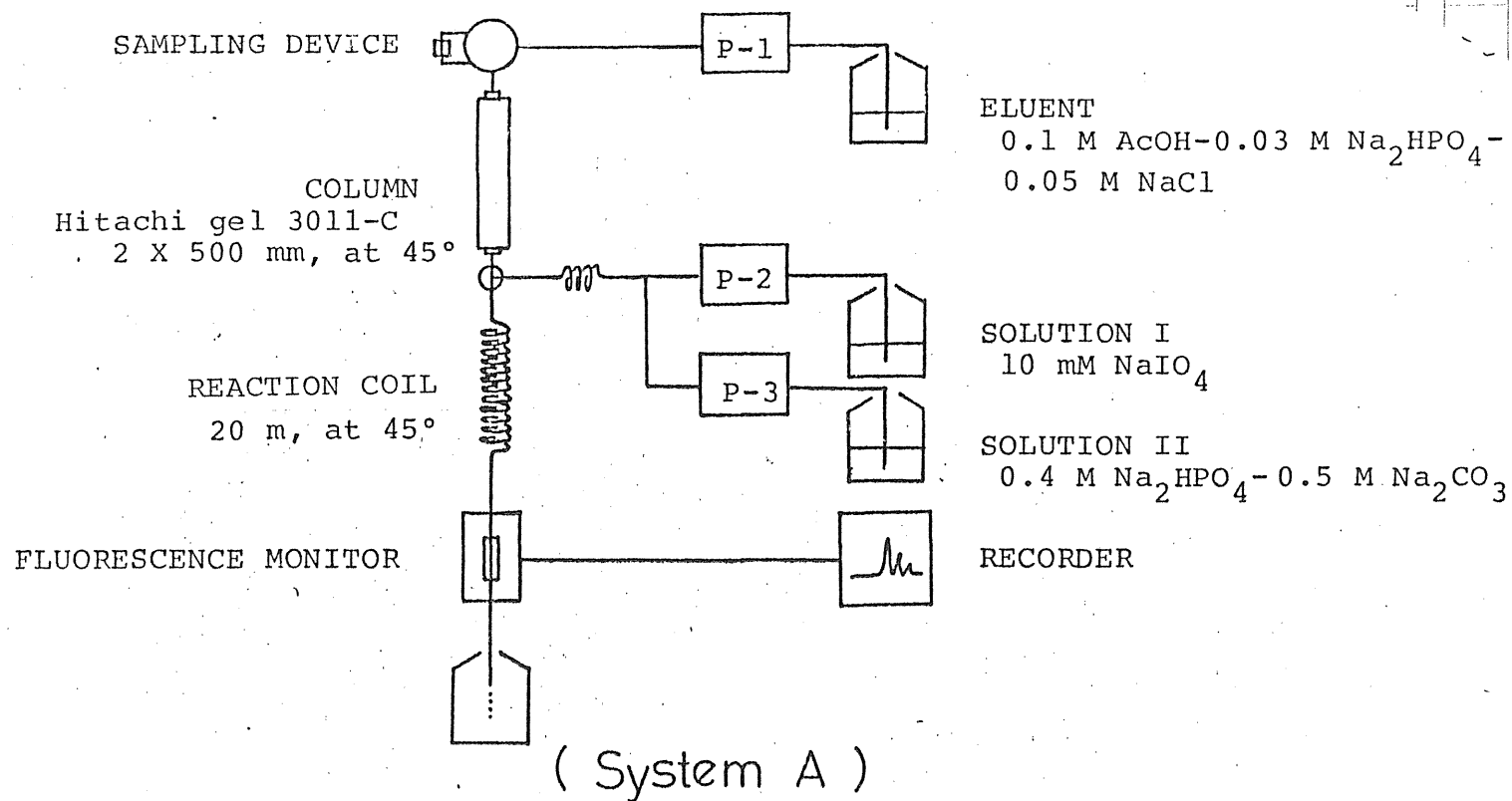


Fig. 13 Flow Diagram for the HPLC Post-column Derivatization

クロマトグラフィ - の条件: カラムは全多孔性陽イオン交換樹脂である日立ゲル 3011-C ( $2 \times 500 \text{ mm}$ ) を用いカラム温度は  $45^\circ$  溶離液は  $0.1 \text{ M}$  酢酸 -  $0.03 \text{ M}$  リン酸 = ナトリウム -  $0.05 \text{ M}$  塩化ナトリウム ( $\text{pH } 4.25$ ), 流速は  $0.70 \text{ ml/min}$  とした (カラム上端の圧力は  $50 \sim 55 \text{ kg/cm}^2$ )。

反応条件: Solution I は  $10 \text{ mM NaIO}_4$  とし、毎分  $0.16 \text{ ml}$  で送液した。Solution II は  $0.5 \text{ M}$  リン酸 = ナトリウム -  $0.4 \text{ M Na}_2\text{CO}_3$  とし、毎分  $0.25 \text{ ml}$  で送液した。

上記測定条件を決めるにあたり、以下のような検討を行った。

#### 1) カラムの選択

カラム担体としてはオクタデシルシラン系の担体である Develosil 5, 10 (野村化学), LS-410 (東洋ソダ), 全多孔性ポリスチレンポリマーの日立ゲル 3010, 3011, そして、全多孔性陽イオン交換樹脂である日立ゲル 3011-p, 日立ゲル 3011-C (日製産業) について、

酸性条件でのトトラヒドロイソキリニ体類の分離を調べた。カラム長はいずれの場合も  $\phi 2 \times 500 \text{ mm}$  とし、検出は  $280 \text{ nm}$  の吸収で行った。その結果、DA-Fp が他成分（カテコールアミン、及びドーパミン、E-Fp, E-Fo, NE-Fp, NE-Fo, En-Fp, DA-Ap）と良好に分離されたのは日立ゲル3011-C だけだったのでカラム担体として採用した。

## ii) クロマトグラフィーの条件

溶離液にはホストカラム反応に用いる  $\text{NaIO}_4$  と反応する可能性のあるシスジオール、あるいは  $\alpha$ -アミールアルコール構造をもつものは避け酢酸を用いた。DA-Fp とドーパミンの溶出位置が最も接近していたのでこの二成分の分離効率 ( $R_s$ )、及び保持容量 ( $k'$ ) から最適条件を選択した。溶離液の pH を変えると Fig. 14 (a) のように pH 4.0 以上で  $R_s$  は 1.0 以上となり分離は良好であったが  $k'$  は大きく、分析時間をかなり要した。そこで、分析時間短縮のために食塩、あるいは  $\text{X}^-$  を

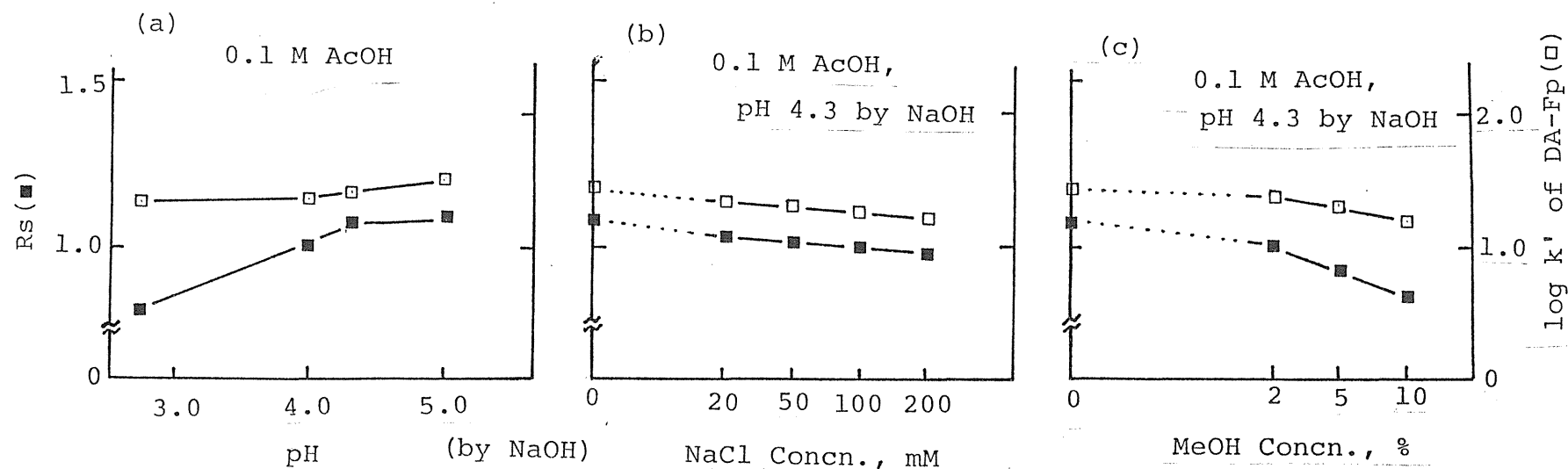
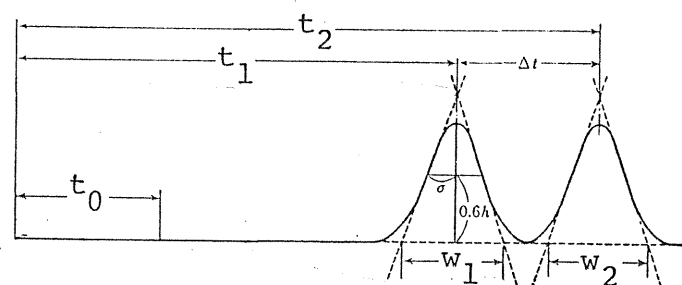


Fig. 14 (a) Effect of pH on the Resolution( $R_s$ ) between DA-Fp and Dopamine and the Capacity Factor( $k'$ ) of DA-Fp  
 (b) Effect of NaCl Concentration  
 (c) Effect of Methanol Concentration



$$R_s = 2(t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$$

$$k' = (t - t_0) / t_0$$

$t_2$ : retention time of DA-Fp  
 $t_1$ : retention time of Dopamine

ルを溶離液に加え、その効果をみた。Fig. 14 (b) (c) の比較からわかるように、二成分の良好な分離を保ちながら分析時間を短縮するには食塩を用いるほうが有利であった。そこで溶離液には 50 mM になるよう食塩を添加した。

流速は 0.40 ~ 0.70 ml/min の間で変化させても、 $R_s$  はほとんど変わらなかった。たので、ポンプの性能と分析時間の短縮を考慮し 0.70 ml/min とした。カラム温度は 25° ~ 45° の範囲では高いほど短時間でよい分離が得られたがカラム寿命を考慮し、45° にした。

### iii) 反応条件

溶離液中の酢酸により本反応の反応速度が小さくなることかわかり、たので、実際に溶離液を用いて、用手法により至適 pH を再検討したところ 9.1 ~ 9.3 であった。HPLC に反応を組み込んだ場合も、クロマトグラム上の DA-Fp のピーク高さは、実際、検出器からの流出液の pH が 9.1 ~ 9.3 のとき最大になった (Fig. 15)。

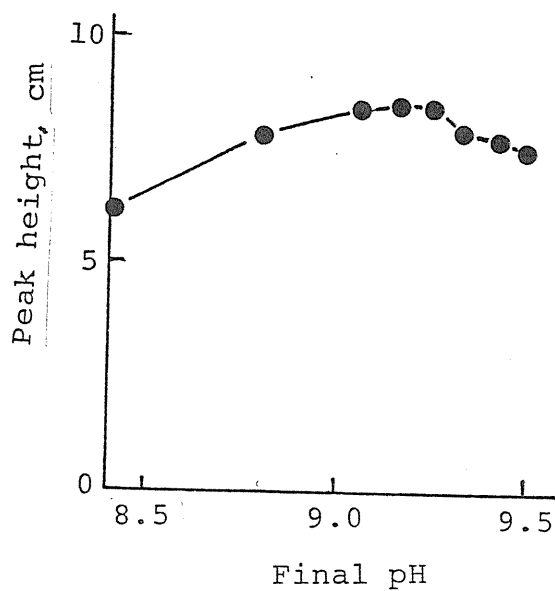


Fig. 15 Effect of Final pH on the Peak Height of DA-Fp  
200 pmol of DA-Fp was used.

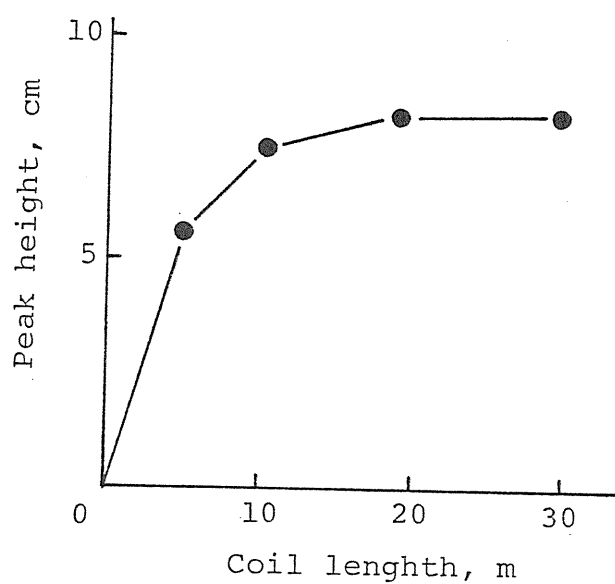


Fig. 16 Effect of Reaction Coil Length on the Peak Height of  
DA-Fp  
200 pmol of DA-Fp was used.

と同じ  $45^\circ$  とし、反響コイル長は  $\phi 5\text{mm} \times 20\text{m}$  とした (Fig. 16)。  $\text{NaIO}_4$  濃度は以上のような条件下、最終濃度を  $0.5$  から  $3.0\text{ mM}$  まで変化させても、ピーク高さにはあまり影響しなかった (Fig. 17)、Solution I を調製簡便な  $10\text{ mM}$  濃度とし、ホーンでの性能上の理由から  $1.5 \sim 1.6\text{ mM}$  とするよう送液した。

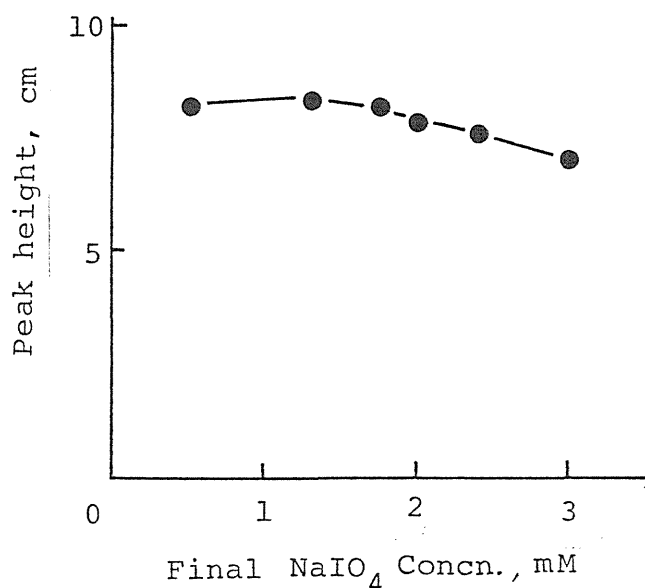


Fig. 17 Effect of  $\text{NaIO}_4$  Concentration on the Peak Height of DA-Fp

200 pmol of DA-Fp was used.



前記測定条件で得た DA-Fp, En-Fp, DA-Ap の  
クロマトグラムは Fig. 18 のようになった。  
そこで、En-Fp を内標とし、内標とのピーク  
高さの比から求めた DA-Fp の検量線は、Fig.  
19 に示すように 2 pmol から 800 pmol まで原点  
を通る直線になった。また本装置の安定

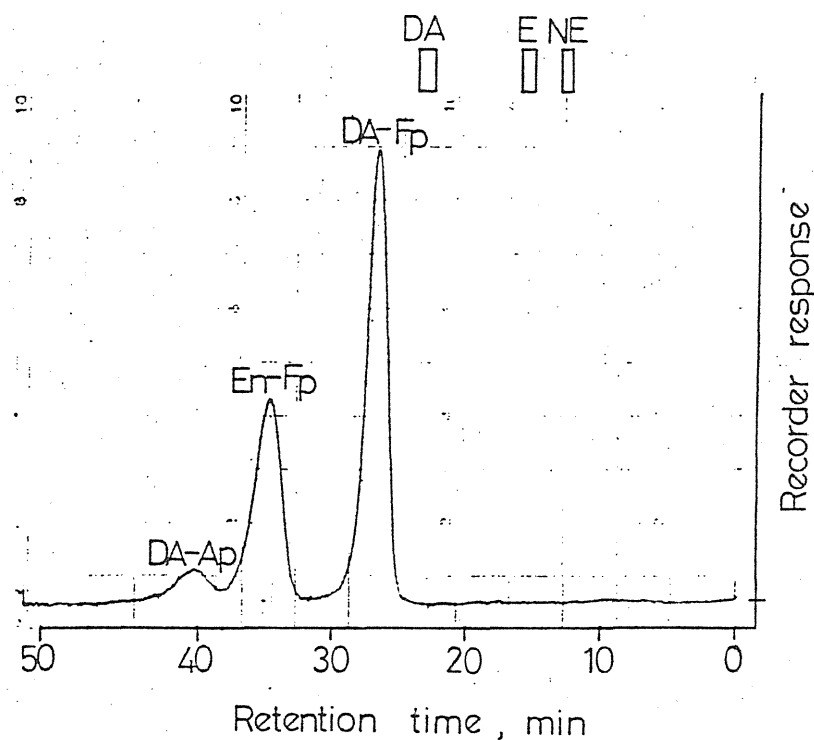


Fig. 18 Chromatogram obtained from a mixture of DA-Fp, En-Fp, and DA-Ap (each 200 pmol).

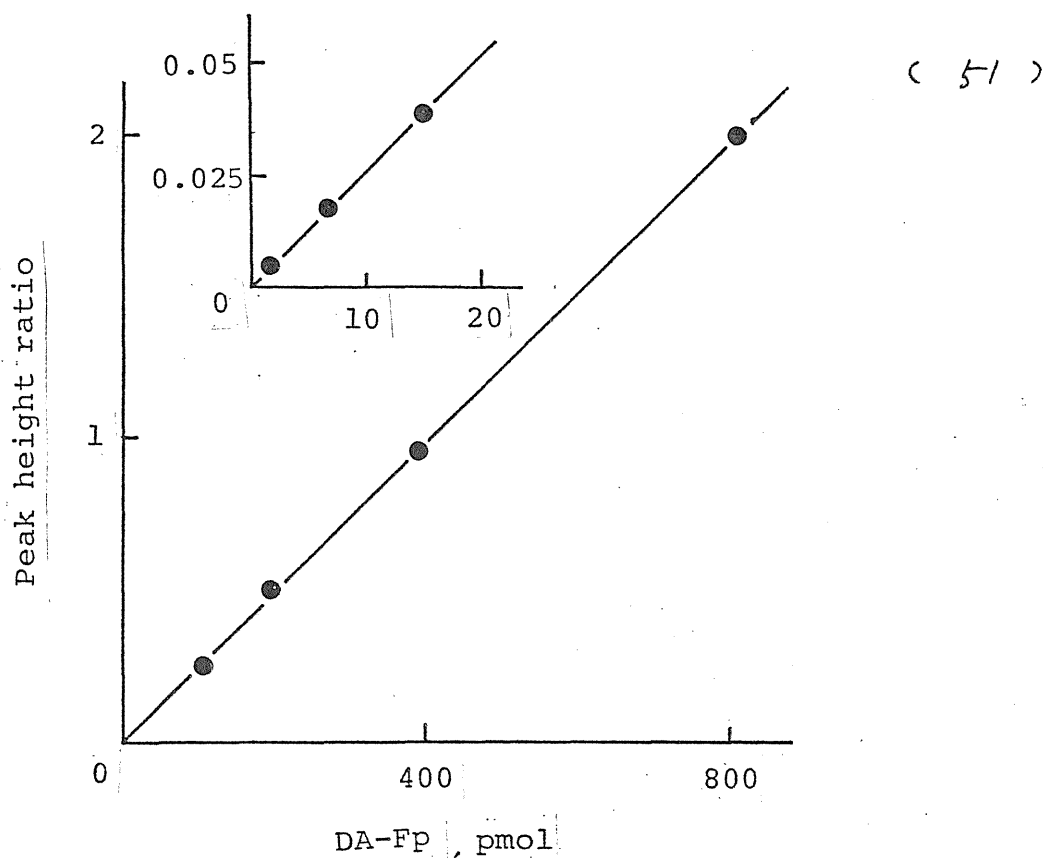


Fig. 19 Standard Curve of DA-Fp with System A  
800 pmol of internal standard was used.

性を調べるため、200 pmol の DA-Fp 及び En-Fp を含んだ標準液を 2 時間置きにカラムに注入して得たピーク高さ比の日内変動は、 $CV = 1.5\%$  ( $n = 5$ ) であった。さらに、濃度の異なった標準液の注入容量を 5  $\mu$ l から 250  $\mu$ l まで変化させ、最終的な注入量を同じにして比較すると、ピーク高さは容量が 100  $\mu$ l 以上では、容量が大きいのほど低くなったが、ピーク高さ比は変化せず、En-Fp を内標にすることで注入容量により測定値は変わらなかった。

### II-3 生体試料中の DA-Fp の抽出

DA-Fp はカテコールをもつアミンであるため、試料の採取、及び、DA-Fp の抽出は基本的にカテコールアミン類の場合<sup>34)</sup>に準じ、アルミナを用いて行なった。しかし、カテコールアミン類の抽出条件では試料などに混入するホルムアルデヒドと、共存するドーミンによりアティファクトとして DA-Fp が生成する二つがわかったため、カテコールアミンと同様ホルムアルデヒドと反応し<sup>35)</sup>(Chart 3)、アルミナ

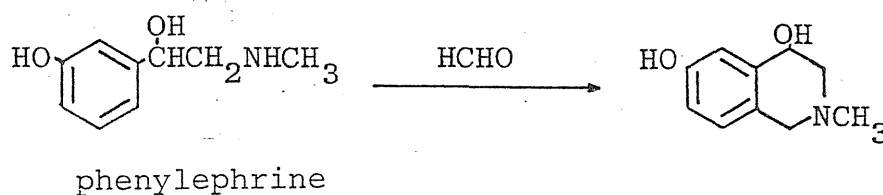


Chart 3 Reaction of Phenylephrine with Formaldehyde

により吸着されないフェニレフリンを試料中に添加して保存、および、前処理過程でのアティファクトの生成を防ぐ。

## DA-Fp の抽出操作 :

Sample

add IS(En-Fp) and 0.5 ml of 10 % phenyl-  
ephrine hydrochloride

hydrolyze at pH 1.5, 80° for 20 min

add 1.0 ml of 10 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$

add 5.0 ml of 0.5 M tris-HCl, pH 8.5, containing  
0.02 M EDTA

adjust pH to 8.5 with aq.  $\text{NH}_3$

add 100 mg of alumina and stir for 10 min

filter the suspension with filter paper

wash alumina on filter paper with water (5 ml X 3)

elute with 0.5 ml of 0.5 N acetic acid

analyze by HPLC ( System A )

Chart 4 Procedure for Pretreatment of Urine Sample

以下に示すよう検討の結果、上記の操作  
法を決めた。通常のカテコールアミン分析  
の場合と異なる点に下線を付した。

## i) 内標の添加。

En-Fp はアルミナに吸着し、HPLC におけ  
る分離も良好なため、内標とした。内標と  
のピーク高さの比較をそれぞれの試料につい  
て検量線を書くと Fig. 20 のようになった。

標準品を直接カラムに注入して作成した検量

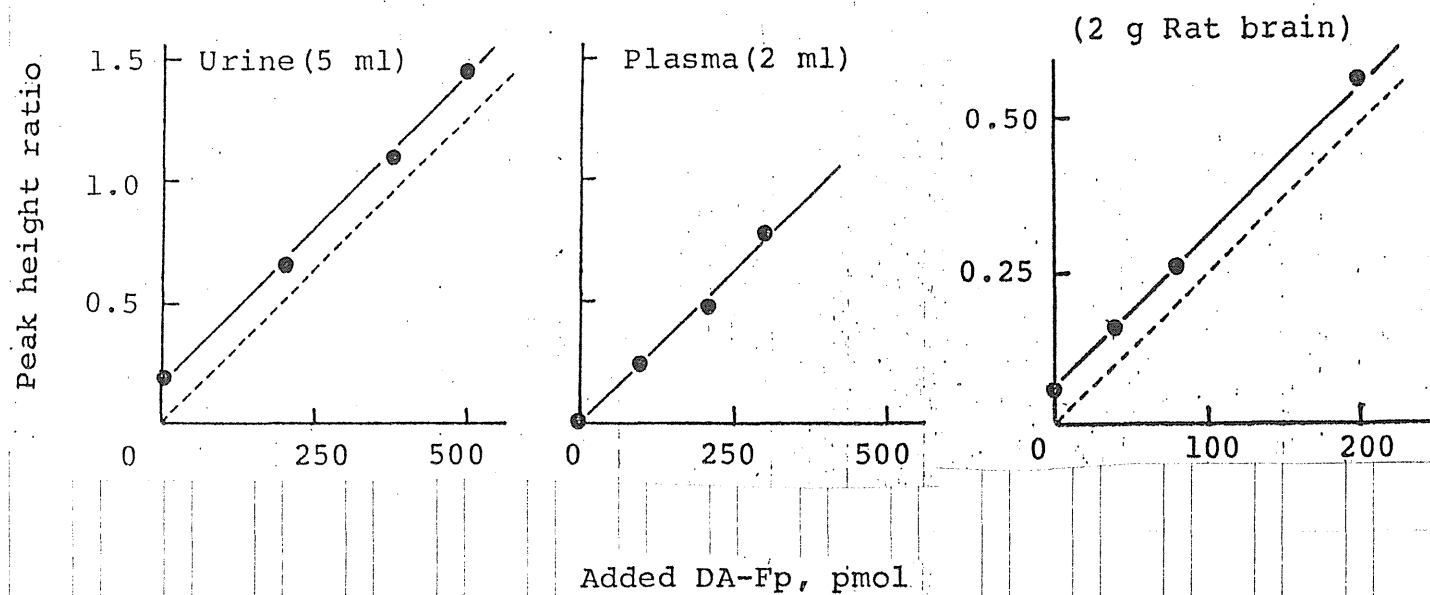


Fig. 20. Working Curves obtained with the Addition of DA-Fp to a Urine or Plasma or Rat Brain Homogenate

800 pmol of internal standard was used.

線を破線で示したが、家兔の尿、血漿、ラットの脳ホモジネイト除蛋白画分を試料としたいずれの場合も、それらと同じ傾きの直線となった。また、生体試料に内標を添加しない場合、クロマトグラム上の内標のピーク位置にはピークは検出されなかった。

## ii) フェニレフリンの添加

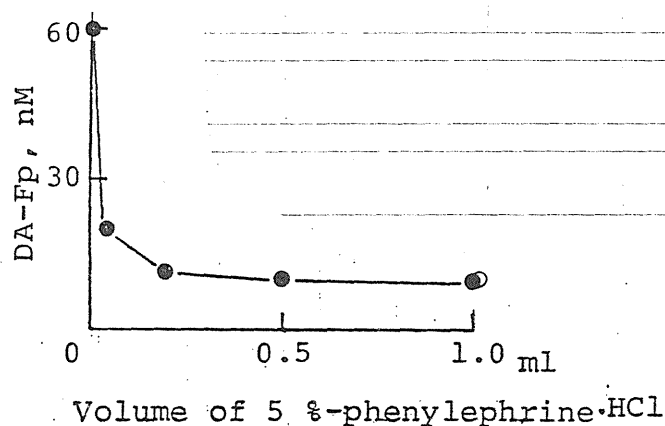


Fig. 21 Effect of Volume of Phenylephrine Solution added to Samples on Artificial Formation of DA-Fp

A urine added dopamine ( $2 \times 10^{-4}$  M) was used as a sample.

ア-ティファクトの生成をみやすくするため、通常尿中に存在するドーパミンの約100倍量の  $2 \times 10^{-4} M$  とするようドーパミンを添加したときの尿(○)を用いて加水分解も含めた場合のフェニレフリンの効果を見ると、Fig. 21 のようになった。フェニレフリンの添加量が少ない場合、ア-ティファクトの生成がみられるが、5% フェニレフリン塩酸塩 1.0 ml を加えると、ドーパミンを添加しない尿試料を分析した場合(○)と測定値が一致し、その生成がほとんどとどえられた。

### iii) $Na_2S_2O_5$ の添加

$Na_2S_2O_5$  も酸化防止以外に、カテコールアミンとアルデヒド類の反応をおさえることが知られており<sup>36)</sup>、また実際、 $Na_2S_2O_5$  の添加が、ア-ティファクトをおさえるのに効果があることがわかったので(Fig. 22)、通常のカテコールアミン分析の場合より過剰に加えた。また、Fig. 21 の実験から用いた蒸留水中にはホルムアルデヒドが含まれていることがわかった。

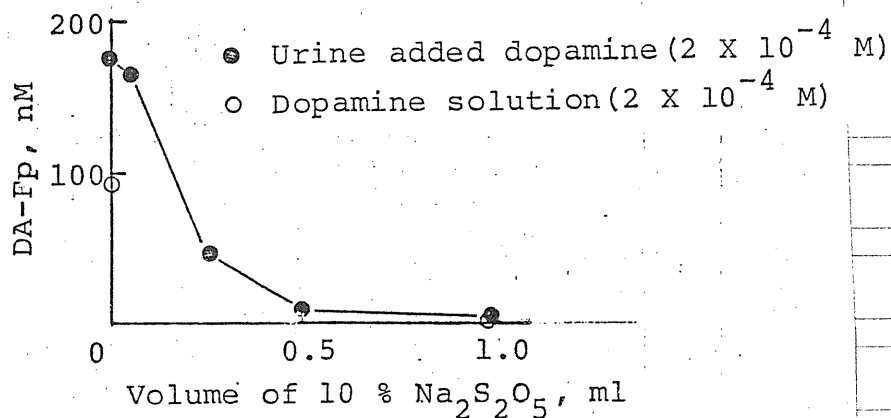


Fig. 22 Effect of Volume of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  Solution added to Samples on Artificial Formation of DA-Fp

Samples were analyzed without addition of phenylephrine and hydrolysis

本抽出操作による DA-Fp, En-Fp の回収率は  
ともに 60% 前後であつた。



## II-4 生体試料中 DA-Fp の定量

### i) 家兎の尿 及び 血漿

尿を分析した場合 Fig. 23 のようなクロマトグラムが得られ、内標に対するピーク高さの比から計算すると、尿 1 ml あたり 20 pmol の DA-Fp が検出された。同一試料に DA-Fp を添加したときのピークを点線で示した。

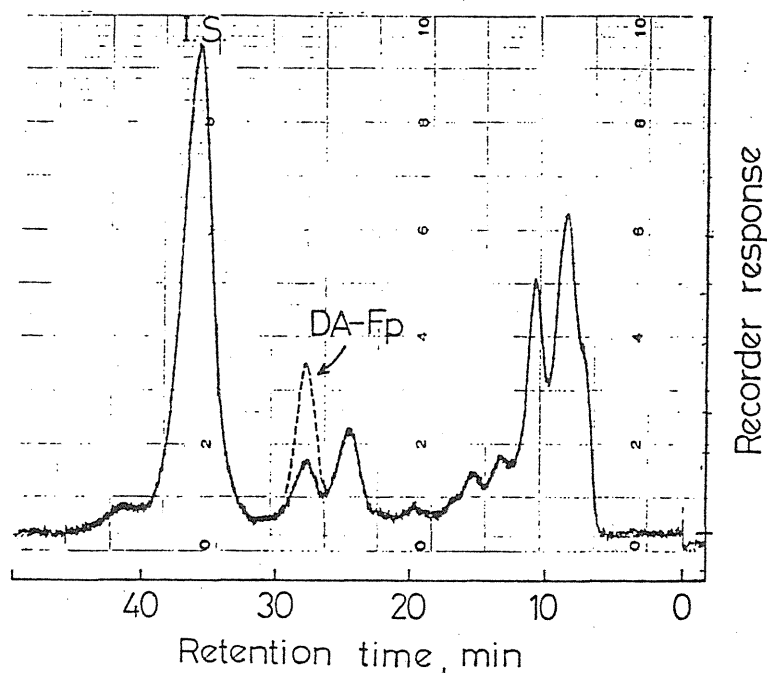


Fig. 23 Chromatogram obtained from a Urine of Rabbit

次に、ドーパミンの前駆物質である L-ドーパを家兎耳静脈より静注したときの尿中 DA-Fp の排泄を調べた。この際、膀胱内での尿の貯留をできるだけふせぐため、カテーテルにより導尿し、L-7C = L-7リンを添加した試験管に連続的に採尿した一時間ごとの蓄尿を分析した。その結果、Fig. 24 のように排泄は L-ドーパ投与後著しく増加した。

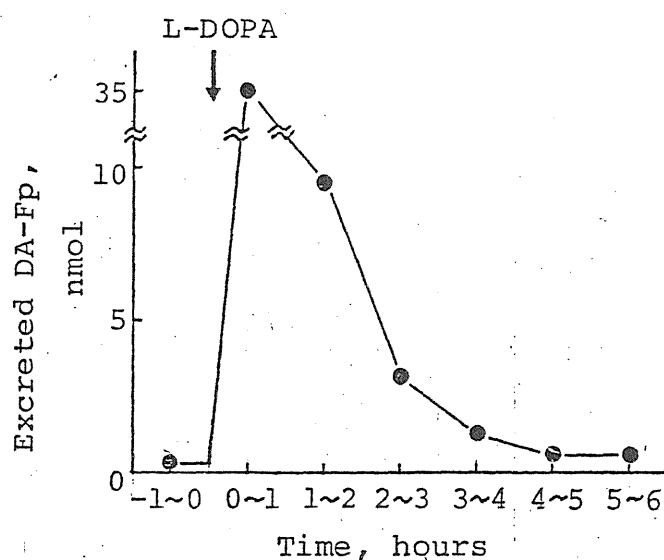


Fig. 24 Excretion of DA-Fp in Urine of a Rabbit administered L-DOPA (25 mg/kg, i.v.)

なお、血漿中には、L-ドーパを投与した場合でも DA-Fp は検出されなかった ( $< 5 \text{ pmol/ml}$ )。

また、L-ドーパ投与尿について加水分解の加温時間の影響をみると、Fig. 25 に示すように、pH 1.5,  $80^{\circ}$ , 10 分の加温で測定値は一定になり、カテコールアミン類の加水分解条件と同様で十分であることを確認した。またこのことから、尿中 DA-Fp は一部抱合体で存在することが示唆された。

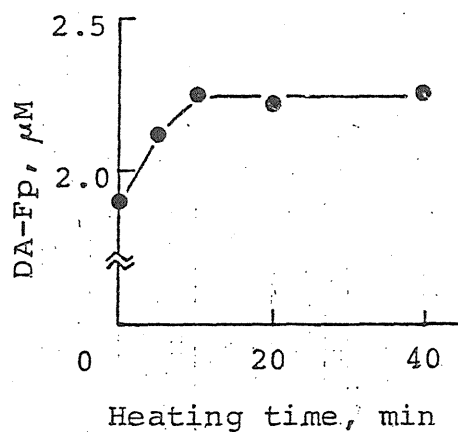


Fig. 25 Effect of Heating Time for Hydrolysis with a Urine of Rabbit administered L-DOPA (25 mg/kg, i.v.)

## ii) ヒトの尿

ヒト尿を分析すると Fig. 26 のように家兎の尿と同様 DA-Fp が検出された。

前日 21 時から絶食した 8 人の健康な成人男子の朝一番尿を分析すると、すべての人から DA-Fp は検出され (Table 5)、平均すると、グラムクレアチンあたり、 $2.8 \pm 1.7 \text{ nmol}$  であった。

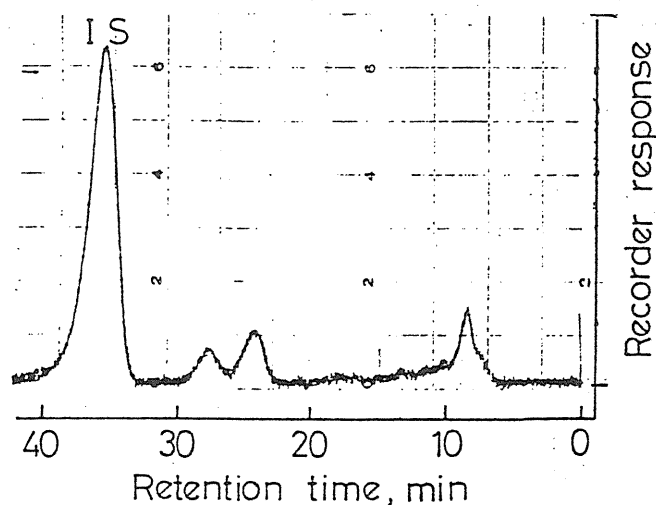


Fig. 26 Chromatogram obtained from a Urine of Man

Table V Determination of DA-Fp Content in Human Urine

Subject	Age (years)	Weight (kg)	DA-Fp content (nmol/g creatinine)
H.N.	36	60	4.6
A.H.	23	70	1.0
Y.M.	23	49	3.4
J.S.	40	54	4.1
A.S.	27	76	2.0
Y.N.	26	55	1.0
T.T.	41	53	5.3
T.T.	32	70	0.8
mean			$2.8 \pm 1.7$

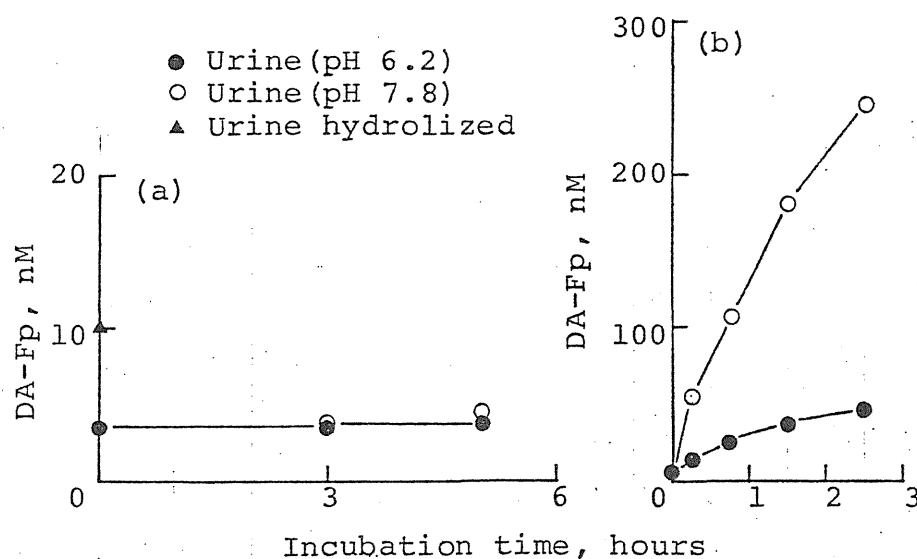


Fig. 27 Effect of Incubation Time on Artificial Formation of DA-Fp in a Urine(a) or Urine added Dopamine ( $4 \times 10^{-5}$  M) (b)

● Urine (pH 6.2) } Samples were analyzed without hydrolysis.  
 ○ Urine (pH 7.8) }  
 ▲ Urine hydrolyzed

すでに尿試料中にはホルムアルデヒドが存在することが Fig. 21 の結果から明らかになっていたので、ヒト尿中に検出された DA-Fp は膀胱という内に尿が貯留している間に生成したものである可能性もある。そこで、ヒト尿は、それにドーパミンを添加したものに於いて、其栓付試験管に密封し、37° でインキュベーションすること、DA-Fp が生成するかどうかを調べた (Fig. 27)。pH 7.8 の尿は採取した尿 (pH 6.2) にブフェニールを加え調整した。ドーパミンを添加した尿では数時間のうちに数十倍から数百倍の DA-Fp が生成し、生成量は pH が高いほうが多かった (Fig. 26 (b))。しかし、ドーパミンを添加しない場合、5時間のインキュベーションによっても DA-Fp の生成はほとんど認められず、ヒト尿で検出された DA-Fp (Table. 5) は膀胱という内で生成されたものでないことが示唆された。

### iii) ラット脳ホモジネイト

ラット脳ホモジネイト除蛋白画分を分析すると、Fig. 28に示すように、ラット脳1gあたり  $8 \pm 2$  pmol ( $n=3$ ) の PA-Fp が検出された。

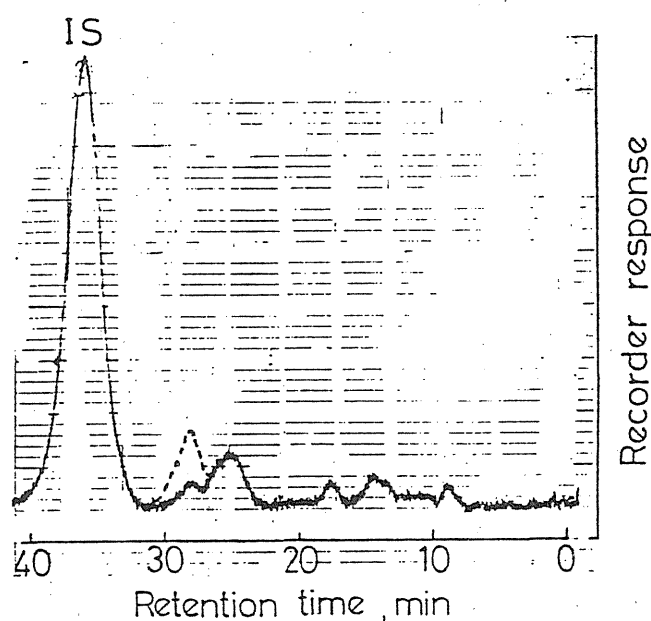


Fig. 28 Chromatogram obtained from Rat Brain

## II-5 測定法の信頼性

本測定法に用いた HPLC (システム A) に対して、Fig. 29 にシステム B として示したような  $\text{NaIO}_4$  による DA-Fp の蛍光生成物をカラムで分離後、その蛍光を検出するクロマトグラムを作成した。そして、本測定法による測定結果の正確度を、Fig. 29 のように、検出ピーク中の蛍光生成物を分離、検出することで確かめた。

システム B での DA-Fp の蛍光生成物のクロマトグラムは前方に試薬のブランクが出現するが、Fig. 30(a) に示すように単一のピークに帰する。また、 $\text{NaIO}_4$  と反応させた En-Fp, DA-Ap, ドーパミンなどの蛍光生成物は DA-Fp の蛍光生成物と異なる保持時間を示した。

そこで、標準品の DA-Fp をシステム A のカラムに注入し、検出されたピーク中の蛍光生成物を一定条件 (記録計が最大応答したとき



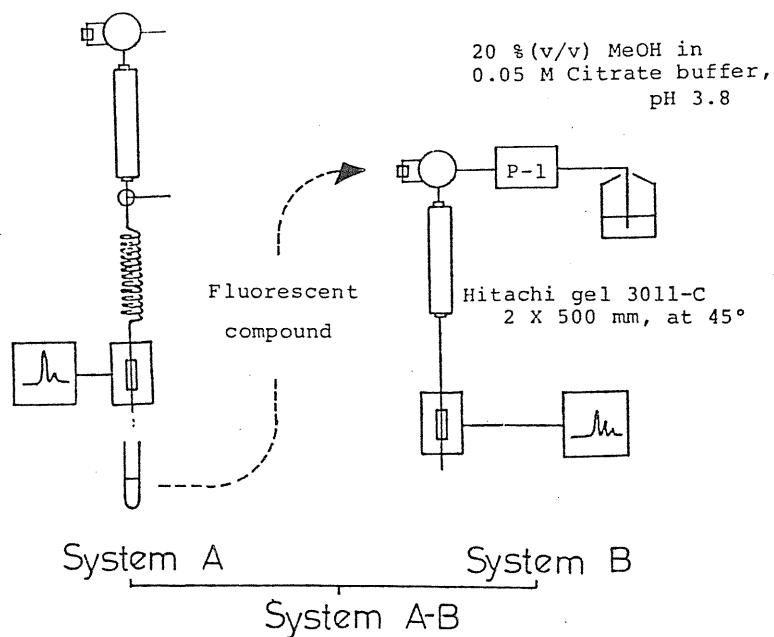


Fig. 29 Diagram of a System for Verification of DA-Fp determined

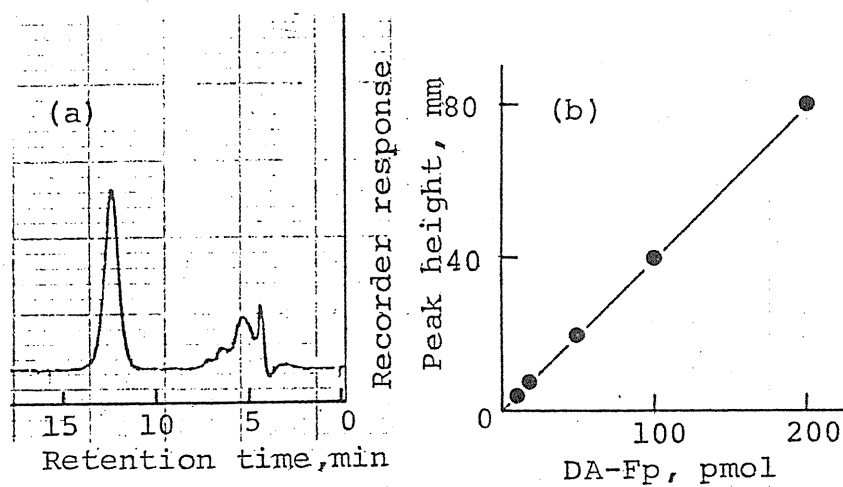


Fig. 30 (a) Chromatogram of DA-Fp reacted with  $\text{NaIO}_4$   
(b) Working Curve of DA-Fp by System A-B

から一分間の排出液を分取し、分取した。その 250  $\mu$ l をシステム B のカラムに注入し、検量線を書くと、Fig. 30 (b) に示すように原点を通る直線となった。

このシステム A-B も、DA-Fp の定量法として用いることがわかったので、家兎及びヒトの尿について同一試料をシステム A 及

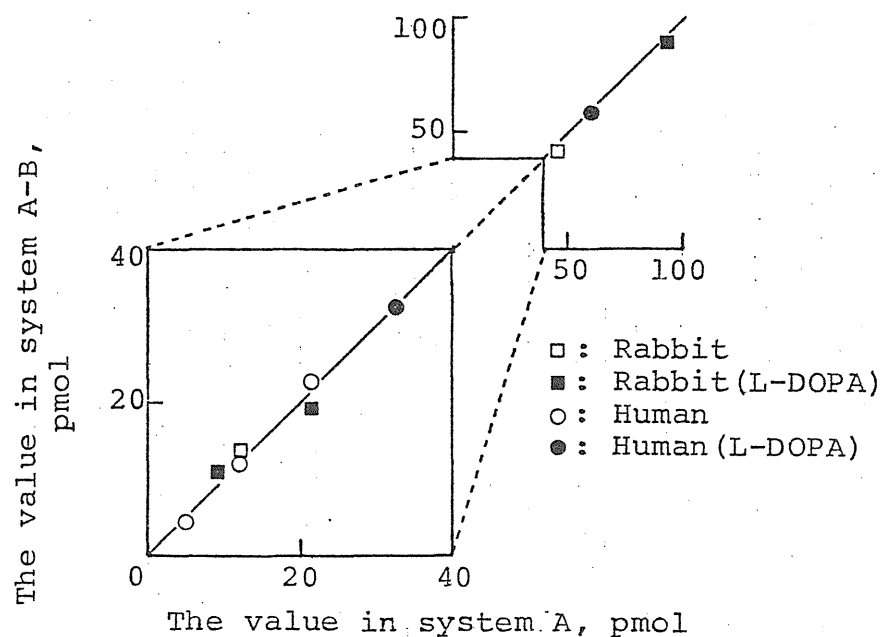


Fig. 31 Verification of Determination Value of DA-Fp for Urine in System A by System A-B

び システム A-B で分析して測定値を比較した。その結果、Fig. 31 に示すように、ほぼ一致した値を示し システム A における測定値が十分信頼できることが示された。

## II-6. 考察

本研究により見出した DA-Fp の高感度検出を可能にする選択性の高い蛍光反応を、HPLC のポストカラム反応に用いることで、他成分に影響されない安定した DA-Fp の測定が可能になった。次に、カテコールアミンと同様アルミナを用いて DA-Fp を比較的選択的に抽出したこと、アルミナ処理の回収を補正する適当な内標を用いたこと、さらに、試料にフェニレフリンを添加してア-Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub> の生成をおさえたことにより、生体試料中の DA-Fp の信頼性の高い、高感度な分析が可能になった。そして、本測定法を用いることで生理的状態の象徴及びヒトの尿、ラット脳ホモジネイトに DA-Fp がはじめに検出された。

本研究で見出された発蛍光は、6,7-ジヒドロキシ-3,4-ジヒドロイソキノリン体の蛍光( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 410/480, nm$ <sup>33)</sup>)とも、また、6,7-ジヒド

ロキシイノキノリンの蛍光 ( $\lambda_{ex}/\lambda_{em} = 330/490\text{nm}$ )<sup>33)</sup>  
とも異なるところから、新しい架蛍光体の生  
成によるものと思われる。

蛍光生成物の構造に關しては、反応収率が  
かなり低く、その単離精製が容易でないので  
現在、検討中である。今までの検討では、  
 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}$  のほぼ等しい、DA-Fp, En-Fp, DA-Ap の  
NaIO<sub>4</sub> による蛍光生成物がシステム B (I-5)  
のクロマトグラフで分離されることから  
1,2 位の置換基が脱離しない構造を有してい  
ることが示唆されている。また、3 位を <sup>14</sup>C  
で、3 位あるいは 4 位をトリチウム標識し  
た DA-Fp を標識ドーパミンから調製し、それ  
らを反応後、システム B により分離して、蛍光  
生成物の比活性 (<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C) を 反応前のそれと  
比較すると、変化がないことから、3,4 位の  
プロトンは反応により脱離しないものと思わ  
れる。また、分離した蛍光生成物の放射能  
から、反応収率は、用手法の条件で 5% 前後  
であると思われる。さらに、蛍光生成物は

アルミニウムやポリ酢酸樹脂に吸着しないことから、  
 カテコールが消失してゐるか、その吸着条件  
 (pH 7.0 から 8.5) で塩基性が失われてゐるもの  
 と思ふれる。螢光生成物の構造が明らかにな  
 りなれば、本測定法の感度の向上や、条件をか  
 へること、NE-Fp, E-Fp など他物質への応  
 用も期待できることから、今後、反応液量も  
 スケールアップすることによる大量調製を試  
 みる予定である。

有機溶媒中に不純物として存在するホルム  
 アルデヒドによるテトラヒドロイソキリ  
 ンの生成に関しては Lauwers<sup>37)</sup> あるいは Cohen<sup>2)</sup>  
 によりすでに報告があるが、本研究により、  
 試料中、あるいは用いた蒸留水中に含まれる  
 ホルムアルデヒドによるテトラヒドロイソキ  
 リンの生成が明らかになった (Fig. 22,  
 Fig. 27)。このように、実験室環境に由来す  
 るホルムアルデヒドにより artifact が生ずる  
 ことは、カテコールアミン関連物質に関する  
 研究ばかりでなく、今後、薬物等の代謝研究

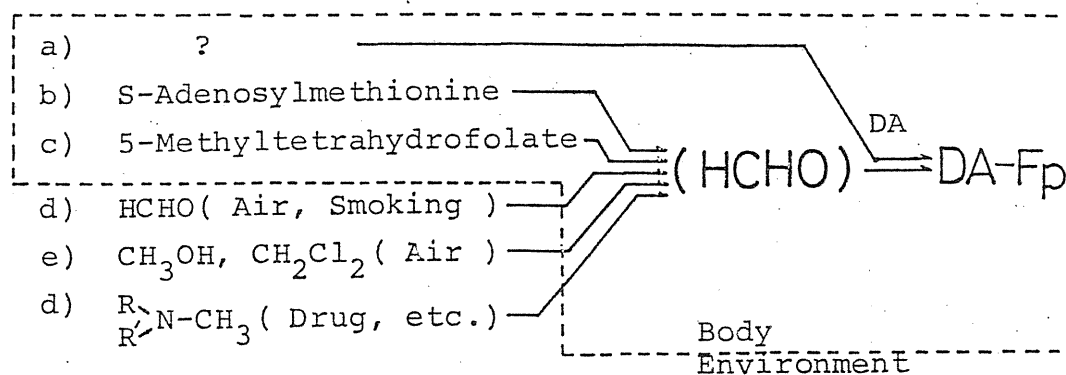
を行なう上でも、十分考慮すべきことと思われ  
れる。

生体試料中に検出した DA-Fp は生体内で生  
成されたものか、食餌に由来するものか明らか  
ではないが、家兎にドーパミンの前駆物質  
である L-ドーパミンを投与すると、DA-Fp の排泄  
量が著しく増加することから生体内での生成  
が示唆される。L-ドーパミン投与の血漿中にも  
DA-Fp は検出されなかったが、それは、L-ドー  
パミン投与によっても血中ドーパミンレベルは  
著しく低いこと<sup>38)</sup>、また、ヒト尿中に排泄され  
る DA-Fp が今まで報告されているドーパミン  
量の数百分の一程度であることなどから、  
DA-Fp が血中に存在していたとしても、その  
濃度が著しく低いためと思われる。

ヒト尿において、DA-Fp が検出されたこと  
は、今後の研究で食餌由来の可能性を除く必  
要があるが、その排泄量の増減と、ヒトにあ  
ける身体的、精神的状態との関連を追及する  
手段として本法が有用であることを示してい

3。

体内で DA-Fp が生成する可能な経路を Chart



DA: dopamine

Chart 5 Possible Route of in vivo Formation of DA-Fp

5にまとめられたが、<sup>13)</sup>ヒトを対象とする場合、内  
 在性の物質に由来するホルムアルデヒド<sup>39)</sup>は<sup>40)</sup>  
 りでなく、喫煙<sup>39)</sup>や、有機溶剤<sup>40)</sup>がその吸収、ま  
 た、薬物の投与などにより直接あるいは間接  
 的にとり込んでいるホルムアルデヒドについ  
 ても考える必要がある。また、Majchrowicz<sup>9)</sup>  
 が指摘するように、アルコール飲料を摂取す  
 ることで内在性のメタノールの代謝が影響を  
 うけ体内に蓄積されたホルムアルデヒドが、



ドーパミンと反応する可能性もある。このように、DA-Fpの生成にはドーパミンからホルムアルデヒドを生成する多くの代謝系の関与が予想され、このような代謝系の研究にも、本測定法が有用な手段となる可能性がある。

ラット脳ホモジネイト中のDA-Fpは検出量が少なく、I-5において測定値の正確度を確かめていないので、参考結果ではあるが、DA-Fpがfalse transmitterとしての作用を有するところから、ヒトの脳内でも生成するのか、さらにその生成は精神状態とかかわりがあるのかどうかは、今後、興味ある課題となろう。

なお、本測定法においては、DA-Fpの異性体であるDA-Foは、標品が得られなかった。しかし、いろいろな条件を変えて反応させた、ドーパミンとホルムアルデヒドとの反応液を、ノルエピネフリンやエピネフリンの縮合異性体(NE-FpとNE-Fo, E-FpとE-Fo)を分離するHPLCやTLCで分析し

ても(Ⅱ-7-iii), 一成分しか確認できないことから, ドーパミンが縮合する場合 DA-Fo の生成量が非常に少ないものと思われる。したがって, 生体試料中に DA-Fo が存在していても, その量は DA-Fp に比べ少量であろうと思われる。

本測定法は, ドーパミン, あるいは, ホルムアルデヒドを DA-Fp に導くことで, それぞれの定量法としても応用が可能であり, 本測定法の開発は, 分析化学的にも多くの意義をもつと思われる。

## I-7. 実験の部

### i) 材料と測定機器

L-フェニレフリン塩酸塩, 6-ヒドロキシ-2-メチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン塩酸塩 (En- $E_p$ ・塩酸塩) は Sigma 社, DL-エピネフリン, L-ノルエピネフリン, DL-ノルエピネフリン, ドーパミン塩酸塩は 半井化学, L-エピネフリンは Merck 社, メタ過ヨウ素酸ナトリウムは 関東化学のものを用い, 他の試薬は, 半井化学, あるいは 関東化学の特級品を用いた。6-ヒドロキシ-2-メチル-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン塩酸塩は 本学, 岡本敏彦教授より御供与戴いた。

$^1H$ -NMR は フェリイ変換 NMR 装置 (日本電子, FMN-FX100) により測定した。蛍光は, 日立分光蛍光光度計, MPF-2A 形により測定した。融点は 柳本製作所の ミクロ融点測定装置により測定した。

## ii) クロマトグラフィ－の機器

システム A : 溶離液送液用として、協和精密社のミニマイクロポンプ KSU-16H, 反応液送液用として同社ミニマイクロポンプ KWH-32H を用いた。蛍光検出機は AMINCO 社製の蛍光比色計を用い、ランプは GE F4T4/BL, 励起フィルターは CORNING 7-60, 発光フィルターは WRATTEN 2A を用いた。記録計は日本分光のデスクトップポリコーダー MRC-100 を用いた。カラム温度は TAMSON 社の恒温装置 T.X.R. 9/100 から送液する温水をカラム外とう管に流すことで 45° に保った。

システム B : システム A に用いた機器を使用した。

### iii) テトラヒドロイソキリニン体の合成

6,7-ジヒドロキニ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキリニン (PA-Fp)・塩酸塩: ドー110ミニ塩酸塩 1 g 及び 35% ホルムアルデヒド 0.5 ml を X71-10 5 ml に加え、45° に 15 分加温した。のち X71-10 を減圧留去した。残渣に少量の 2N 塩酸を加え溶解し、アセトンをさらに加え、結晶を得た。2N 塩酸、アセトンにより 3 回再結晶して白色結晶 (250 mg) を得た。mp 256° dec. (Ref.<sup>41)</sup> 263°)

<sup>1</sup>H-NMR (重水 5% 溶液)  $\delta$ : 2.96 (2H, t,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}_2-$ ), 3.48 (2H, t,  $J = 6.8 \text{ Hz}$ ,  $-\text{CH}_2-$ ), 4.22 (2H, s,  $-\text{CH}_2-$ ), 6.67 (1H, s, Ar-H), 6.71 (1H, s, Ar-H). Anal. Calcd. for  $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{O}_2\text{NCl}$  C; 53.63, H; 6.00, N; 6.95 Found C; 53.50, H; 6.02, N; 6.81.

7,8-ジヒドロキニ-1,2,3,4-テトラヒドロイソキリニン (PA-Fo): 10 エピネフリニヤエ

ビネフリンの場合には, NE-Fo, E-Fo が多く生成されるトリス緩衝液中, pH 7.0, マトローニンとホルムアルデヒドを反応させ, その反応液をシリカゲル 3011-C の HPLC (I-5-V) で分析すると, DA-Fp と同じ保持時間を示す一成分しか確認できなかった。また, 同い反応液をシリカゲル薄層クロマトグラフ (プレート: Silica Gel 60F (Merck), 展開溶媒; マタール / 酢酸 / 水 = 3 / 1 / 1) で分析しても DA-Fp と同じ Rf 値 (0.55) をもつ一成分しか確認できなかった。pH を変えて反応を行っても同様の結果が得られ, DA-Fo の生成を確認することはできなかった。ホルムアルデヒドを用いた縮合により DA-Fo の標品を調製することはできなかった。

4,6,7-トリヒドロキシー-1,2,3,4-テトラヒドロイソキノリン (NE-Fp) 塩酸塩: DL-1,2,3,4-

ビネブリン塩酸塩をホルムアルデヒドと Sagers  
 の条件で反応させ NE-Fp 塩酸塩 (180 mg)  
 を得た。 mp  $172^{\circ}$  dec (Ref<sup>(42)</sup>  $172^{\circ}$ ). Anal  
 Calcd. for  $C_9H_{12}O_3NCl \cdot H_2O$  C; 45.86, H;  
 5.99, N; 5.97 Found C; 45.80, H; 5.94,  
 N; 5.82.  $^1H-NMR$  スペクトルは既知データと  
 符合した。

4.78-トリクロロキシ-1,2,3,4-テトラヒド  
 ロイロキリリン (NE-Fo) 塩酸塩: DL-1ルエ  
 ビネブリン塩酸塩 1 g を用い。 E-Fo の調製法  
 と同様に調製し。白色結晶 (110 mg) を得た。  
 mp  $190^{\circ}$  ( $180^{\circ}$  から着色) (Ref<sup>(42)</sup>  $196-198^{\circ}$ )  
 Anal Calcd for  $C_9H_{12}O_3NCl$  C; 49.67, H; 5.56  
 N; 6.44. Found: C; 49.40, H; 5.59, N; 6.33.  
 $^1H-NMR$  スペクトルは既知データと符合した。

6.7-ジクロロキシ-1-キチル-1,2,3,4-テトラヒ  
 ドロイロキリリン (DA-AP) 塩酸塩: ドーハ  
 ミン塩酸塩 0.5 g を用い。 King の方法によ  
 り調製し。キチル-1-ルエ-1,2,3,4-テトラヒド

品 2 F ( 180 mg )。 mp.  $231^{\circ}$  ( Ref. <sup>43)</sup>  $231^{\circ}$  )

Anal Calcd for  $C_{10}H_{14}O_2NCl$  C, 55.60; H, 6.54; N, 6.50; Found C, 55.61; H, 6.58; N, 6.34.

$^1H$ -NMR スペクトルは既知データと符号した。

#### iv) 試料の採取 及び保存

家兎： 尿はカテーテルにより導尿し、6 N 塩酸により pH 1.5 としたのち、1% とする。そうしてフェニルニ塩酸塩を加え、 $-20^{\circ}$  で保存した。血漿は2% EDTA-10% フェニルニ塩酸塩を十分の一容量 耳静脈より採取した血液に加え、血漿を分取した。リード-110の投与実験では、耳静脈より kg あたり 25 mg のリード-110を投与した。

ヒト： 尿は排尿を家兎の場合に準じ、保存した。

ラット： 脳ホモジネイトは wistar 系ラット (♂, 400~450g) を断頭後、すみやかに脳を切除しドライアイスにて凍結、秤量し、脳重量あたり5倍量の1% フェニルニ塩酸塩



- 0.4N 過塩素酸を加え、ガラスホモジナイザーにて組織を粉碎して調製した。 10000.g  
20分遠心したのち上澄を分取し、脳ホモジネイトの除蛋白画分として  $-20^{\circ}$  で保存した。

## Reference

- 1) B. Falck, S. Jacobsson, S. Lindvall and U-B. Niethé, Scand. J. Plast. Reconstr. Surg., 10, 185 (1976).
- 2) G. Cohen, Biochem. Pharmacol., 25, 1123 (1976).
- 3) R. Deitrich and V. Erwin, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 20, 55 (1980).
- 4) M. Sandler, S.B. Carter, K.H. Hunter and G.M. Stern, Nature, London, 241, 439 (1973).
- 5) M.A. Collins, W.P. Nijm, G.F. Borge, G. Teas and C. Goldfarb, Science, 206, 1186 (1979).
- 6) M.A. Collins and M.G. Bigdeli, Life Sci., 16, 585 (1975).
- 7) M.G. Hamilton, M. Hirst and K. Blum, Life Sci., 25, 2205 (1979).
- 8) J.M. Lasala, and C.J. Coscia, Science, 203, 283 (1979).
- 9) E. Majchrowicz, Adv. Exp. Med. Biol., 56, 111 (1975).
- 10) A.J. Turner, Biochem. Pharmacol., 26, 1009 (1977).
- 11) 白幡 晶, 吉岡正則, 田村善蔵, 日本薬学会第 99 年会講演要旨集, 1979 年, 札幌, p. 324.
- 12) T.M. Kenyhercz and P.T. Kissinger, J. Pharm. Sci., 67, 112 (1978).
- 13) J. Axelrod, Science, 150, 892 (1965).
- 14) M.G. Bigdeli and M.A. Collins, Biochem. Med., 12, 55 (1975).
- 15) G.W. Wood and N. Mak, Anal. Chem., 48, 981 (1976).
- 16) M.R. Riggan and P.T. Kissinger, Anal. Chem., 49, 447A (1977).
- 17) T. Nagatsu. "Biochemistry of catecholamine", Univ. of Tokyo Press, 1973, Chapter IV.
- 18) M. Yoshioka, A. Miwa, Z. Tamura, "Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers", VI ed. by E. Usdin, I. Kopin and J. Barchas, Pergamon Press. Inc., New York, 1979, p 868.
- 19) A. Miwa, M. Yoshioka, A. Shirahata and Z. Tamura, Chem. Pharm. Bull., 25, 1904 (1977).
- 20) A. Miwa, M. Yoshioka and Z. Tamura, Chem. Pharm. Bull., 26, 3347 (1978).
- 21) 吉岡正則, 坂本育美, 田村善蔵, L.O. Sillerud and W.H. Konigsberg, 日本薬学会第 100 年会, 講演要旨集, 1980, p 575.
- 22) N. Kucharczyk, J. Yang and R.D. Sofia, Biochem. Pharmacol., 28, 2219 (1979).

- 23) S.A. Baker, J.A. Monti and S.T. Christian, *Biochem. Pharmacol.*, 29, 1049 (1980).
- 24) E. Meller, H. Rasengarten, A.J. Friedhofh, R.D. Stebbins and R. Silber, *Science*, 187, 171 (1975).
- 25) R.C. Creveling, J.W. Daly, B. Witkop and S. Udenfriend, *Biochem. Biophys. Acta*, 64, 125 (1962).
- 26) R.J. Lefkowitz and L.T. Williams, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 515 (1977).
- 27) K. Engelman and B. Portony, *Circ. Res.*, 26, 53 (1970).
- 28) S. Higa, T. Suzuki, A. Hayashi, I. Tsuge and Y. Yamamura, *Anal. Biochem.*, 77, 18 (1977).
- 29) N. Kirshner and McC. Godall, *J. Biol. Chem.*, 226, 207, (1957).
- 30) T. Hino and T. Kaito, *Bunseki Kagaku*, 26, 451 (1977).
- 31) C.T. Mansfield, B.T. Hodge, R.B. Hege Jr. and W.C. Hamlin, *J. Chromatogr. Sci.*, 15, 301 (1977).
- 32) G. Cohen and M.A. Collins, 167, 1749 (1970).
- 33) H. Corrodi and G. Jonsson, *J. Histochem. Cytochem.*, 15, 65 (1967).
- 34) P. Hjemdahl, M. Daleskogand and T. Kahan, *Life Sci.*, 25, 131 (1979); A.H. Anton and D. Sayre, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 145, 326 (1964).
- 35) T. Kaito, *Yakugaku Zasshi*(Tokyo), 95, 985 (1975).
- 36) T.M. Kenyhercz and P.T. Kissinger, *J. Pharm. Sci.*, 67, 112 (1978).
- 37) W. Lauwers, J. Leysen, H. Verhoeven, and P. Laduron, *Biomed. Mass. Spectrum*, 2, 15 (1975).
- 38) K. Imai, M. Sugiura, Z. Tamura, K. Hirayama and H. Narabayashi, *Chem. Pharm. Bull.*, 18, 2134 (1970).
- 39) H. Sprince, C.M. Parker and G.G. Smith, *Agents and Actions*, 9, 407 (1979).
- 40) A.E. Ahmed and M.W. Anders, *Biochem. Pharmacol.*, 28, 2021 (1978).
- 41) J.S. Buck, *J. Am. Chem. Soc.*, 56, 1769 (1934).
- 42) R. Sarges, *J. Heterocycl. Chem.*, 11, 599 (1974).
- 43) A.M. Hjort, E.J. deBeer, J.S. Buck and L.O. Randoll, *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, 263 (1942).
- 44) G. King, B.L. Goodwin and M. Sandler, *J. Pharm. Pharmacol.*, 26, 478 (1974).

## 謝 辞

本研究に際し、終始御指導、御鞭撻を賜はり、  
ました東京大学医学部 田村善蔵教授、  
並びに、同医学部、吉岡正則講師に、深く感謝  
致します。

また、有益な御助言、御討論を戴きました、  
東京大学薬学部、今井一洋助教授、中村洋博  
士、矢沢幸平博士、また、同学部、薬品分析  
化学教室の方々に厚く感謝致します。